

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

ANIELLE DE PINA COSTA

**INVESTIGAÇÃO DE CASOS DE MALÁRIA
AUTÓCTONE NA MATA ATLÂNTICA DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO DE
2006 A 2013**

Rio de Janeiro
2014

Investigação de casos de malária autóctone na Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro de 2006 a 2013

ANIELLE DE PINA COSTA

Tese apresentada no Curso de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração Doenças Infecciosas.

Orientadoras: Dr^a. Patrícia Brasil & Dr^a. Martha Cecília Suarez-Mutis.

Rio de Janeiro

2014

ANIELLE DE PINA COSTA

**VIGILÂNCIA DA MALÁRIA NA REGIÃO
EXTRA-AMAZÔNICA:
DESCRIÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICO-
LABORATORIAL DOS CASOS ATENDIDOS EM UMA
UNIDADE SENTINELA**

Orientadoras: Dr^a. Patrícia Brasil e Dr^a. Martha Cecília Suarez-Mutis

Aprovada em 30 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro (Presidente)

Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz

Dr^a. Elizabeth de Souza Neves

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz

Dr^a. Joseli Oliveira Ferreira

Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Mariano Gustavo Zalis

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Dr. Pedro Luís Tauil

Universidade de Brasília – UnB

Dr. Luiz Henrique Conde Sangenis (SUPLENTE)

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C837 Costa, Anielle de Pina

Investigação de casos de malária autóctone na Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro de 2006 a 2013 / Anielle de Pina Costa. – Rio de Janeiro, 2014.

xxiii, 189 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2014.

Bibliografia: f. 153-199

1. Malária. 2. Transmissão autóctone. 3. Rio de Janeiro. 4. Inquérito. 5. Primatas não-humanos. 6. Kerteszia. 7. MSP1-19. I. Título.

CDD 616.9362

DEDICATÓRIA

*Dedico a minha mamãe, Glória, pelo amor e presença
em todos os momentos da minha vida.*

A Laurinha, Stella e Pietro.

*Ao meu Avô, Gercino, que se foi, mas deixou plantado em
mim o seu amor e ternura. Saudade é uma palavra insuficiente...*

*Tudo começou
Voa comigo e mostra
Você sempre disposta
Já de cara aceitou*

*Sempre me ensinou
Vai nessa vida aposta
Voa pro que mais gosta
Me incentivou*

*Mamãe eu te avisei na hora de sair
Olha eu não volto se eu não conseguir
Faz muito tempo e eu aqui de volta*

*Pai tem tanta gente boa por aí
Com essa missão que é de fazer sorrir
Felicidade essa é minha escola*

*"Bóra" que o vento não me derrubou
E a turbulência por aqui passou
Aproveita e decola
Atrás do teu sonho meu amor...*

*Vou atrás, vou atrás .. levo o amor a alegria e a paz ...
Decola eu quero é mais!*

Decola, Falamansa

*Você já sabe, me conhece muito bem
Eu sou capaz de ir e vou muito mais além
Do que você imagina...*

*E eu não desisto assim tão fácil, meu amor
Das coisas que eu quero fazer e ainda não fiz
Na vida tudo tem seu preço, seu valor
E eu só quero dessa vida é ser feliz!
Eu não abro mão nem por você, nem por ninguém
Eu me desfaço dos meus planos
Quero saber bem mais
Que os meus 20 e poucos anos*

*Tem gente ainda me esperando pra contar
As novidades que eu já canso de saber
Eu sei também tem gente me enganando
Mas que bobagem
Já é tempo de crescer...*

Vinte e poucos anos, versão Raimundos (Fábio Jr).

AGRADECIMENTOS

Então, a menina da cidade do interior, que leva cinco horas diárias em trajetos entre a sua casa e a Fiocruz conseguiu... No início, era só um desejo, defender o mestrado para ingressar no doutorado, sem a confiança da maioria, mas, confiando em meu potencial consegui chegar até aqui.

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter me ajudado a concluir mais esta etapa. Foram muitas dificuldades e lágrimas, mas sempre que eu pensava em desistir, rezava e pedia forças para continuar. À Nossa Senhora, por estar sempre comigo, me abençoando e protegendo.

Meu maior e mais especial agradecimento ao meu Avô, exemplo de homem, que me mostrou que a melhor e maior qualidade que existe é a generosidade. Até hoje não houve um só dia em que eu não me lembrasse daqueles nossos dias, até hoje não houve um só dia em que eu não me lembrasse de “você”! O meu maior e mais verdadeiro obrigado é seu!

À minha Mamãe, por ser tão dedicada e companheira. Por estar comigo em todos os momentos, me apoiando e rezando por mim, por entender minhas ausências, suportar meu mau-humor e apoiar meu trabalho mesmo sem saber exatamente do que se tratava. Obrigada por ser a melhor mãe do mundo!

Ao meu Papai, pelo orgulho e incentivo.

Ao Alexandre pelo exemplo e conselhos, Mozarth por estar sempre disponível, sempre comigo, Leonardo que mesmo do outro lado do mundo está sempre tão perto, Kátia e Irlane pelo incentivo e entusiasmo.

À minha Avó por ser sempre uma fortaleza.

À Maria Carolina, prima-irmã com quem divido sonhos.

À tia Fátima por ser presente mesmo na ausência.

Ao meu Padrinho Gercino Filho por seu exemplo, conselhos e generosidade. Quero ser como você!

A todos da minha família que acreditaram que eu poderia chegar aqui.

Às minhas amigas de Teresópolis por compartilharem comigo as minhas angústias ao longo desta jornada e por entenderem minhas ausências. À todos os colegas pela torcida e apoio e à todos aqueles que neste momento fogem a minha memória, mas que, de alguma forma, deram sua contribuição...

A todos os meus colaboradores, sem vocês esta tese não existiria. De forma especial à Cesare Bianco Júnior, que me ajudou como um verdadeiro professor, me acompanhando nas viagens de campo, me orientando em relação aos procedimentos realizados e na execução das técnicas laboratoriais. Meu verdadeiro muito obrigado!

À Denise Anete Alvarenga, que precisei viajar até o Centro de Pesquisas René Rachou em Belo Horizonte para conhecer. MUITÍSSIMO obrigada por sua ajuda, dedicação e considerações. A todos do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou, em especial Dra Cristiana Brito.

Ao Dr. Mariano Gustavo Zalis, por ensinar coisas tão complexas de forma tão simples.

À Hermano Gomes Albuquerque por toda colaboração e disponibilidade em me ajudar com a construção dos mapas e pelo esclarecimento das dúvidas sobre ecologia e Mata Atlântica.

À Mariana Pereira Araújo do Programa Nacional de Controle da Malária (PCNM) por sua ajuda e presteza em relação aos dados de malária no país.

As minhas queridas “*Patricetes*”, Renata Saraiva Pedro, Carolina Romero e Clarisse Bressan, pela amizade, incentivo e torcida a longo da minha caminhada na Fiocruz. À Cecília Lameirinhas Longo, no início PIBIC e hoje já médica, à Otilia Lupi e a todos do Laboratório de Doenças Febris Agudas do IPEC.

À toda equipe do Laboratório de Parasitologia do IPEC, em especial Sidnei Silva e Eduardo Machado por toda a ajuda e atenção.

Ao brilhante Sr. Francisco das Chagas Luz, por me receber tão bem em Brasília e dividir seus conhecimentos comigo.

Ao Dr. Alcides Pissinati, por sua colaboração, ajuda e dedicação.

À todos do Laboratório Transmissores de Hematozoários do IOC, em especial ao Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, exemplo de pesquisador, à Dra. Teresa Fernandes Silva do Nascimento e Roberto Peres.

À Dra. Joseli de Oliveira Ferreira (Lila), por todas as conversas e explicações e por sempre me receber tão bem em seu laboratório e se dispor a ser colaboradora do

meu projeto já na reta final. Ao Dr. Josué da Costa Lima Junior por toda ajuda na execução e interpretação das técnicas laboratoriais.

Aos queridos colegas do CPD-Mal, em especial à Cláudia Castro, por toda ajuda e presteza.

À Fiocruz por me proporcionar estar diante dos melhores cientistas do país. À Fiotec e Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) pelo apoio estrutural e financeiro.

Aos pacientes e funcionários da Fiocruz pela presteza, confiança e carinho. E a todos que de alguma forma ficaram felizes com o meu progresso, o meu muito obrigado.

À Dra. Martha Cecília Suarez Mutis, por dividir seus conhecimentos sobre malária, por sua ajuda e orientação e pela avaliação criteriosa deste trabalho que, sem dúvida, acrescentou muito mais do que eu originalmente poderia ter realizado.

Ao Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, por me acolher em seu laboratório, me ajudar nas articulações e colaborações, me orientar e estar sempre disposto a me ouvir, mesmo quando isto não sendo programado.

À Dra. Patrícia Brasil, minha orientadora querida, por ajudar na construção da minha trajetória desde 2007, por sua orientação, preocupação, compreensão e confiança. Por ser mais que uma orientadora de trabalhos científicos, por ser um exemplo de médica e pessoa, de caráter ímpar e generosidade sem limites; praticamente minha segunda mãe. À Maria, por dividir sua mãe comigo por longos momentos.

RESUMO

A transmissão autóctone da malária no estado do Rio de Janeiro foi considerada eliminada em 1968; entretanto, casos autóctones esporádicos são descritos em diferentes regiões do estado cobertas por Mata Atlântica, sendo escassos os dados referentes aos mecanismos de transmissão e das formas de apresentação clínica da doença. A autoctonia em estados vizinhos ocorre em números superiores aos do Rio de Janeiro e a infecção por *Plasmodium* em macacos onde ocorrem casos favorece a hipótese de que a malária nessas regiões possa ser uma zoonose. Baseados nesses antecedentes, avaliamos os aspectos epidemiológicos, clínicos, sorológicos e moleculares de 14 casos autóctones adquiridos na região de Mata Atlântica no estado e atendidos no período de 2006 a 2013 no IPEC/Fiocruz. Também estimou-se a prevalência de infecção por *Plasmodium* na vizinhança dos casos através de inquérito sorológico e molecular. Foram capturados e identificados nas regiões onde ocorreram os casos, vetores nos quais se pesquisou a presença de plasmódio através de exame molecular. Foi feita igualmente a investigação e caracterização molecular da infecção por *Plasmodium* em um grupo de símios de um Centro de Primatologia localizado na Mata Atlântica do estado. A maioria dos casos ocorreu em visitantes, nos meses mais quentes do ano, e todos tiveram infecção por *P. vivax*. Contudo, a análise microscópica das lâminas positivas demonstrou que, fenotipicamente, os parasitos se apresentavam de forma atípica, com um menor número de merozoítos no interior dos esquizontes quando comparado com o de *P. vivax* clássico. No inquérito sorológico foram observados anticorpos contra todas as variantes de CSP de *P. vivax*, com predomínio da VK 210 (91%). Na pesquisa de anticorpos anti-CSP de *P. malariae/brasilianum*, 36% dos casos tiveram pelo menos uma amostra positiva, assim como 73% dos casos tiveram pelo menos uma amostra positiva para anticorpos anti-CSP de *P. falciparum*. A genotipagem dos microssatélites dos parasitos identificados nos casos apontou para uma grande diversidade genética. Identificou-se duas situações epidemiológicas distintas que podem ser caracterizadas como de dois perfis: o de casos das regiões montanhosas, de Serra (Guapimirim, Teresópolis, Sana, Macaé de Cima e Lumiar) com agente etiológico fenotipicamente diferente do *P. vivax*, cursando com baixa parasitemia; sintomatologia que se inicia com febre diária e depois assume padrão terçã clássico e evolução clínica sub aguda. Sob o ponto de vista entomológico houve predomínio de mosquitos do sub-gênero *Kerteszia* (particularmente *Anopheles kerteszia cruzii*), mas nenhum espécime foi positivo para plasmódio em exame molecular. Detectou-se frequência elevada de sorologia positiva para a proteína 1-19 da superfície do merozoíta (MSP1-19) de *P. vivax* na população contactante vizinha, embora os exames moleculares em busca de parasitos nesses indivíduos tenham sido negativos. As características das regiões associadas à presença do vetor apoiam a hipótese da malária nestas localidades de vales e montanhas ser autóctone. O outro perfil epidemiológico é o encontrado em áreas de planície nas localidades de Santana de Japuíba (Cachoeiras de Macacu) e Sapucaia, no qual os casos se apresentaram com um plasmódio semelhante ao *P. vivax* tradicional no que se refere à morfologia, à parasitemia e aos aspectos clínicos da doença resultante da infecção. Nessas regiões, predominaram os *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* (nenhum positivo para plasmódio em exame molecular) e a população vizinha contactante também apresentou negatividade em todos os exames moleculares mas com baixa frequência de sorologia positiva para a MSP1-19 de *P. vivax*. De forma complementar, foram examinados 30 primatas das famílias *Cebidae* e *Atelidae* do Centro de Primatologia (CPRJ) em Guapimirim, e 30% tiveram PCR positivo [cinco (56%) infectados por *P. malariae/P. brasilianum*, três (33%) por *P. vivax/P. simium* e um (11%) por *P. malariae/P. brasilianum* e *P. vivax/P. simium* (infecção mista)]. A presença de plasmódio nesses animais de cativeiro aponta para a circulação de plasmódio na região, confirmada pela investigação do óbito de um primata de vida livre do gênero *Alouatta* que teve amostra positiva para *P. simium/P. vivax* no exame molecular. Este estudo descreve, pela primeira vez, a infecção de primatas da família *Cebidae* com *P. simium*.

Palavras chave: malária – transmissão autóctone – Rio de Janeiro – inquérito – primatas não humanos – *kerteszia* – MSP1-19.

ABSTRACT

The autochthonous malaria transmission in the state of Rio de Janeiro was considered as eliminated in 1968. However, sporadic autochthonous cases are described in different regions covered by the Atlantic Forest in the state and scarce data regarding the transmission mechanisms and clinical forms of the disease are available. The number of autochthonous cases in the neighboring states is higher and *Plasmodium* infection in monkeys make possible the hypothesis that malaria may be a zoonosis in these regions. Based on these facts, we evaluated the epidemiological, clinical, serological and molecular features of 14 indigenous malaria cases acquired in the region of the Atlantic Forest in the state that were diagnosed and treated at the IPEC, Fiocruz, Rio de Janeiro, from 2006 to 2013. We have also estimated the prevalence of *Plasmodium* infection in the contacting vicinity of the cases by serological and molecular investigation. We identified the species of the vectors captured in areas where the cases occurred and none of them was found, by molecular tests, to be carrying parasites. The molecular characterization of *Plasmodium* infection was also made in a group of monkeys from a Primatology Centre located in Guapimirim, in the Atlantic Forest of the state. Most cases occurred in visitors during the warmer months of the year and all had infection by *P. vivax*. However, the microscopic examination of the blades showed that, phenotypically, the parasites in positive samples presented atypically with less numerous merozoites within the schizonts as compared with the classical *P. vivax*. Serologically, antibodies to all *P. vivax* CSP variants were observed, with predominance of the variant VK210. Concerning the *P. malariae* / *brasilianum* CSP, 36% of cases had at least one positive sample for the presence of specific antibodies, and 73 % had at least one positive sample for anti *P. falciparum* CSP antibody. The microsatellite genotyping of parasites identified in the cases pointed to a large genetic diversity. We identified distinct epidemiological situations that were grouped into two profiles: the cases of mountain regions, *Serra* (Guapimirim, Teresopolis, Sana, Macaé de Cima and Lumiar) having a *P. vivax* phenotypically different as etiologic agent. They coursed with subacute clinical outcome, low parasitemia and symptomatology starting with daily fever, which then assumes tertian classical pattern. The prevalence of mosquitoes of the sub-genre *Kerteszia* (particularly *Anopheles Kerteszia cruzii*) was higher in the region as was the frequency of positive serology for the *P. vivax* merozoite surface protein 1-19 (MSP1-19) in the neighbouring contacting-population that, however, presented as negative in the molecular tests. The characteristics of the regions associated with the presence of this vector support the hypothesis of autochthonous malaria in these locations valleys and mountains. The other clinical epidemiological profile of the locations of Japuiba Santana (Cachoeiras de Macacu) and Sapucaia, where lowland areas, and the *Plasmodium* found in the majority of cases resembling traditional with regard to clinical features and parasitemia. As far as the entomological research is concerned, *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* predominated. Contacting local residents also showed negative molecular tests in all samples but with low frequency of positive serology for *P. vivax* MSP1-19, contrasting to the other epidemiological profile. Complementarily, 30 primates of the *Cebidae* and *Atelidae* families were examined, and 30% of them had a positive PCR [five (56%) infected with *P. malariae* / *P. brasilianum*, three (33%) with *P. vivax* / *P. simium* and one (11%) with *P. malariae* / *P. brasilianum* and *P. vivax* / *P. simium* (mixed infection)]. The presence of these animals with *Plasmodia* points to the circulation of malaria in the region, as confirmed by the investigation of the death of a free-living primate of the genus *Alouatta* that as shown to be positive for *P. simium* / *P. vivax* in the molecular analysis. For the first time the *Cebidae* family primates was found infected with *P. simium*.

Keywords: malaria - autochthonous transmission - Rio de Janeiro - survey - non-human primates - *Kerteszia* - MSP1-19.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição dos casos de malária no Brasil em 2012	3
Figura 2	Ilustração hipotética da transmissão da malária simiana a humanos	14
Figura 3	Distribuição de vetores de malária no estado do Rio de Janeiro	22
Figura 4	Distribuição de vetores de malária no estado do Rio de Janeiro – <i>Anopheles (Ker.) cruzii</i>	23
Quadro 1	Avaliação semi-quantitativa da densidade parasitária de <i>Plasmodium</i> pela microscopia em gota espessa de sangue	34
Quadro 2	Intensidade da reação de IFI em cruces	41
Figura 5	Mapa de divisão geopolítica do estado do Rio de Janeiro	43
Quadro 3	Iniciadores (primers) utilizados no estudo	55
Gráfico 1	Casos autóctones registrados na região Sudeste (SP, MG, ES e RJ) e no estado do Paraná no período de 2006 a 2013	59
Figura 6	Uso e cobertura do solo das localidades com casos autóctones de malária no estado do Rio de Janeiro	63
Figura 7	Uso e cobertura do solo das localidades com casos autóctones de malária no estado do Rio de Janeiro	64
Figura 8	Imagens de satélites das localidades com casos autóctones de malária no estado do Rio de Janeiro	65
Figura 9	Focos de malária autóctone identificados no estado do Rio de Janeiro e delimitação dos municípios com casos	66
Quadro 3	Distâncias em quilômetros entre os pontos com casos de malária autóctone	67
Figura 10	Representação da distância total e distância entre os casos de malária identificados na região do Sana	68
Figura 11	Representação da distância total e distância entre os casos de malária identificados na região de Guapimirim	69
Figura 12	Imagens de satélites da localidade de Lumiar, Nova Friburgo, RJ	71
Figura 13	Imagens de satélites da localidade do Garrafão, Guapimirim, RJ	72
Figura 14	Local de exposição do caso 7	74
Figura 15	Condomínio identificado como local provável de exposição do caso 8	76

Figura 16	Numerosas bromélias na vizinhança do local de exposição do caso 9	77
Figura 17	Sede do PARNASO em Teresópolis, RJ	78
Quadro 4	Características clínico-epidemiológica-laboratoriais dos casos autóctones atendidos no IPEC no período de 2006 a 2013	80
Gráfico 2	Correlação entre o início dos sintomas e o diagnóstico e a parasitemia dos casos	81
Quadro 5	Características clínicas dos casos de malária autóctones da Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro	83
Quadro 6	Parâmetros clínicos e laboratoriais utilizados para identificação de casos com gravidade	85
Quadro 7	Caracterização molecular dos parasitos de amostras humanas a partir da análise de fragmentos e caracterização do receptor DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines) dos pacientes	89
Quadro 8	Resultado da sorologia dos pacientes incluídos no estudo	91
Gráfico 3	Representação da frequência de amostras positivas na região do Garrafão e sua titulação	100
Gráfico 4	Representação da frequência de amostras de soro positivas na localidade de Monte Olivette e sua titulação	101
Gráfico 5	Representação da frequência de amostras positivas na localidade de Santana e sua titulação	102
Gráfico 6	Representação da frequência de amostras positivas na localidade de Cabeceira do Sana e sua titulação	103
Gráfico 7	Representação da frequência de amostras positivas na localidade de Macaé de Cima e sua titulação	104
Gráfico 8	Frequência de <i>Anopheles (Kerteszia) cruzii</i> coletados mês a mês na localidade do Sana, Macaé	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de casos, local e ano de notificação da malária autóctone no estado do Rio de Janeiro	60
Tabela 2	Número de casos autóctones de malária notificados no estado do Rio de Janeiro e número de casos identificados no Ambulatório de Doenças Febris Agudas (DFA/IPEC).	61
Tabela 3	Síntese do número de indivíduos incluídos no inquérito	96
Tabela 4	Amostras testadas e frequência dos soros humanos reativos a MSP-1 ₁₉	98
Tabela 5	Número de anofelinos coletados por localidade pesquisada	105
Tabela 6	Mês de coleta, número de horas de captura e número de <i>An. cruzii</i> capturados	108

DEFINIÇÃO DE TERMOS

Definição de caso de malária adquirida na Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro:

Foi considerado caso de malária adquirida na Mata Atlântica, o indivíduo sintomático com diagnóstico clínico de malária confirmado por exame microscópico direto ou molecular, após visita ou moradia em região de Mata Atlântica e que não apresentava história de deslocamento para áreas endêmicas de malária; uso compartilhado de seringas; hemotransfusões; ou transplantes de órgãos e tecidos; e que não residiam em áreas próximas a aeroportos.

Outras definições:

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1961), a malária pode ser classificada de acordo com a origem de sua aquisição:

- **Caso autóctone:** é quando um caso se origina em uma localidade onde exista fonte de infecção.
- **Caso importado:** ocorre quando uma infecção é contraída fora do local onde o indivíduo reside.
- **Caso introduzido:** é um caso secundário direto derivado de um caso importado conhecido em áreas onde a transmissão foi interrompida.
- **Caso induzido:** está relacionada à aquisição da malária por meio de transfusões sanguíneas, transmissão parenteral, compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas com plasmódios.

- **Caso críptico:** caso de malária diagnosticado em área com transmissão interrompida quando não se consegue comprovar o local de infecção.

Foram utilizados como critérios epidemiológicos:

- **Visitante frequente** – definido como o indivíduo que se desloca para a região estudada no mínimo quinzenalmente e pernoita no local.
- **Visitante ocasional/espórádico** – definido como o indivíduo que se deslocou para a região estudada no mínimo em uma oportunidade e pernoitou no local.
- **Morador** – definido como o indivíduo que reside na região estudada por no mínimo dois anos.

IPA – Índice Parasitário Anual - Número de exames positivos de malária, por mil habitantes, segundo local provável de infecção, no ano considerado. No Brasil, o risco de contrair malária é classificado de acordo com o IPA (Brasil MS, 2007).

- Áreas de alto risco para malária (IPA > 49,9 casos/1.000 habitantes): áreas de transmissão intensa favorecida pelo tipo de ocupação e exposição das pessoas.
- Áreas de médio risco (IPA de 10 a 49,9): áreas de transmissão bem delimitadas, melhores condições para o desenvolvimento de medidas de controle, melhor infra-estrutura dos serviços de saúde e maiores facilidades de comunicação.
- Áreas de baixo risco (IPA de 0,1 a 9,9): áreas com baixa transmissão da malária, porém, continuam sendo receptivas e vulneráveis, considerando o potencial malarígeno, o que eventualmente pode dar origem a focos restritos.
- Áreas não-endêmicas (IPA = zero): áreas onde a transmissão de malária foi interrompida ou nunca existiu.

- **Anemia** - Para o diagnóstico da anemia, foi considerado como marcador fundamental o valor de hemoglobina (g/dL) para homens: hemoglobina ≤ 13.0 g/dL, e para mulheres: hemoglobina ≤ 11.0 g/dL).
- **Anemia Grave** - Valor de hemoglobina (Hg) g/dL: ≤ 7 g/dL.
- **Choque** - Pressão sistólica ≤ 80 mm/Hg ou sinais de hipoperfusão tecidual.
- **Exame padrão ouro para o diagnóstico de malária** - Gota espessa.
- **Infecção assintomática** - Indivíduo que apesar da detecção de parasitemia não apresentou nenhum sintoma ou sinal clínico 30 dias antes e até 30 dias depois da coleta da amostra sem ter sido tratado com medicamentos antimaláricos no período.
- **Insuficiência Renal Aguda** - Diurese < 400 ml/dia ou 12ml/kg/dia segundo critérios da OMS.
- **Malária cerebral** - Caracterizada por diminuição do nível de consciência, convulsões ou coma em paciente com diagnóstico clínico-laboratorial de malária.
- **Manifestação hemorrágica** - Presença de petéquias ou relato de epistaxe, hematúria, melena ou qualquer sangramento referido pelo paciente com diagnóstico clínico-laboratorial de malária.
- **Período provável de incubação** - Tempo decorrido entre a saída do local de transmissão e o início dos sintomas
- **Sangramento ativo** - Sangramento espontâneo não vaginal.

- **Sinais de hipovolemia** - Hipotensão arterial (pressão sistólica ≤ 90 mm/Hg), desidratação, oligúria e lipotímia associada à hipotensão postural.
- **Tríade Clássica da Malária** – Calafrios, febre, e sudorese.
- **Tríade Comum da Malária** – Calafrios, febre, e cefaléia.
- **Trombocitopenia ou Plaquetopenia** - Redução do número de plaquetas no sangue, contagem inferior a 150.000/mm³.
- **Trombocitopenia/Plaquetopenia grave** - Redução do número de plaquetas no sangue, contagem inferior a 50.000/mm³.

Nomes populares dos primatas não humanos descritos neste estudo:

Cebidae

- *Cebus sp* - macaco prego híbrido
- *Aotus nigriceps* - macaco da noite da cabeça preta

Atelidae

- *Alouatta g. clamitans* - macaco bugio-ruivo

LISTA DE ABREVIATURAS

- % - Porcento
- μl - Microlitro
- **ALT** - alanina aminotransferase
- **AST** - aspartato aminotransferase
- **CEP** - Comitê de Ética em Pesquisa
- **CEUA** - Comissão de Ética no uso de Animais
- **CPD-Mal** - Centro de Pesquisa Diagnóstico e Treinamento em Malária da Fundação Oswaldo Cruz / Fiocruz. Centro de Referência da Secretária de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde para o diagnóstico de malária na Região Extra-Amazonica
- **CPqRR** – Centro de Pesquisa Rene Rachou – Fiocruz/Minas
- **CSP** - Proteína circunsporozoíta
- **DFA** - Doença Febril Aguda
- **DNA** - Ácido desoxirribonucléico/Deoxyribonucleic acid.
- **DO** - Densidade ótica
- **ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou teste imunoenzimático.
- **Fiocruz** - Fundação Oswaldo Cruz

- **Fiotec** - Fundação para o desenvolvimento científico e tecnológico em saúde.
- **GPS** - Global Positioning System ou sistema de posicionamento global.
- **GLURP** - Proteína Glutamato- Rica em *P. Falciparum*
- **IBAMA** - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
- **IFI** - Reação de Imunoflorescência Indireta
- **INI** - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- **INFECCÃO MISTA** - Infecção concomitante de duas espécies, por exemplo: *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, associação mais frequente no Brasil
- **INM** - Instituto Nacional de Meteorologia
- **IOC** - Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz
- **IPA** - Índice Parasitário Anual. Razão entre o número de casos de malária e a população da localidade X 1.000
- **IPEC** - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, atualmente designado Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- **IR** - Índice de reatividade
- **LACEN** - Laboratório Central Noel Nutels. Laboratório de Referência Estadual para o diagnóstico de malária
- **MS** - Ministério da Saúde

- **MSP** - Proteína de superfície de merozoítos. *Merozoite surface protein*
- **OMS** - Organização Mundial da Saúde
- **PCR** - Reação em cadeia de polimerase / *Polymerase Chain Reaction*
- **PNCM** - Programa Nacional de Controle da Malária - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
- **P. falciparum** - *Plasmodium falciparum*
- **P. falciparum + P.vivax** - Infecção mista: Associação das duas espécies: *Plasmodium falciparum e Plasmodium vivax*
- **P. malariae** - *Plasmodium malariae*
- **P. vivax** - *Plasmodium vivax*
- **SERVICO DE DFA** - Serviço de Doenças Febris Agudas/Ipec/Fiocruz.
- **SVS** - Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde
- **TGO** - Transaminase oxalacética
- **TGP** - Transaminase pirúvica
- **UnB** - Universidade de Brasília
- **WHO** - World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
MARCO TEÓRICO	2
<i>Aspectos epidemiológicos da malária no Brasil e no mundo</i>	2
<i>A malária no Brasil fora da Amazônia – breve histórico e atualidades</i>	4
<i>A Mata Atlântica brasileira e o estado do Rio de Janeiro</i>	9
<i>O agente etiológico</i>	11
<i>O ciclo biológico do parasito no homem</i>	16
<i>O vetor e a transmissão</i>	18
<i>A Doença e o Diagnóstico</i>	24
JUSTIFICATIVA	28
OBJETIVO GERAL	30
<i>Objetivos específicos</i>	30
MÉTODOS	31
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA	31
<i>Desenho do estudo</i>	31
<i>Local do atendimento</i>	31
<i>Seleção e Caracterização dos Casos</i>	32
<i>Critérios de elegibilidade</i>	32
<i>Coleta de Dados Clínicos e Epidemiológicos e Acompanhamento dos Casos</i>	32
<i>Instrumento de coleta e Base de dados</i>	33
ENSAIOS LABORATORIAIS	33
<i>Exame direto</i>	33
<i>Caracterização morfológica do parasito</i>	35
<i>Exame molecular</i>	35
<i>Caracterização molecular através da análise de fragmentos</i>	36
<i>Caracterização do receptor DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines)</i>	36
<i>Tratamento</i>	36
ASPECTOS SOROLÓGICOS	37
<i>Pesquisa de anticorpos IgG contra a proteína recombinante MSP-1₁₉ de P. vivax por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)</i>	37
<i>Detecção de anticorpos IgG contra epítomos repetidos da proteína circumsporozoíta (CSP) de P. falciparum e P. malariae e contra as variantes de CSP de P.vivax</i>	38
<i>Reação de Imunofluorescência Indireta – IFI - para detecção de anticorpos contra estágios eritrocitários de P.vivax</i>	39
ANÁLISE ESPACIAL DOS CASOS E CONFECÇÃO DOS MAPAS	41
INQUÉRITO	42
<i>Local do estudo</i>	42
<i>Origem da população estudada</i>	43
<i>Logística das visitas a campo</i>	44
<i>Critérios de inclusão, exclusão, seleção e caracterização da população exposta</i>	45
<i>População estudada</i>	45
<i>Coleta de dados</i>	45
<i>Seguimento</i>	46

<i>Coleta e processamento de amostras</i>	46
<i>Pesquisa de plasmódio</i>	46
<i>Inquérito sorológico</i>	47
<i>Considerações éticas</i>	47
CARACTERIZAÇÃO DE VETORES	48
<i>Captura de adultos</i>	48
<i>Coleta de larvas</i>	48
<i>Identificação das espécies</i>	48
<i>Pesquisa de plasmódio nos vetores</i>	48
ESTUDO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS	51
<i>Inquérito molecular nos primatas não humanos</i>	52
<i>Sequenciamento das amostras de símios positivas</i>	56
<i>Inquérito sorológico nos primatas não humanos</i>	56
<i>Considerações éticas</i>	57
ANÁLISE DE DADOS	58
RESULTADOS	59
DISCUSSÃO	113
CONCLUSÕES	147
LIMITAÇÕES DO ESTUDO	151
PERSPECTIVAS	152
REFERÊNCIAS	153
ANEXOS	175
Anexo I	175
Anexo II	182
Anexo III	184

INTRODUÇÃO

Apesar dos milhares de casos de malária notificados no Brasil a cada ano, hoje a parasitose apresenta-se como uma doença restrita quase que exclusivamente à região amazônica, área de transmissão ativa no país. Na região extra-amazônica, a maioria dos casos de malária autóctone ocorre em áreas próximas à Mata Atlântica, mais descritos de forma sistemática nos estados de São Paulo e Espírito Santo, com detecção de casos com baixa parasitemia e sintomatologia branda. Existem poucas descrições de casos com transmissão local no estado do Rio de Janeiro, região totalmente inserida no bioma da Mata Atlântica brasileira e área sabidamente com presença de bromélias, local utilizado pelos mosquitos do gênero *Kerteszia* como criadouro.

A ocorrência de casos autóctones é determinada por meio da avaliação do potencial malarígeno da região, que está relacionado com receptividade e vulnerabilidade da área. A receptividade se mantém pela presença, densidade e longevidade do vetor anofelino, e a vulnerabilidade é causada pela presença ou chegada de portadores de plasmódio, humanos ou não. Sabe-se que a malária foi endêmica no estado do Rio de Janeiro até meados da década de 1960, contudo, esses casos eram descritos em áreas distintas dos locais em que a maioria dos casos ocorrem atualmente. Até o momento existe uma lacuna de conhecimento referente aos prováveis hospedeiros, aos mecanismos de transmissão e das formas de apresentação clínica da malária adquirida na região de Mata Atlântica, que parecem ser diferentes da Região Amazônica. Atualmente, acredita-se que a malária na Mata Atlântica seria uma zoonose e não uma antroponose como ocorre nas regiões endêmicas.

É possível que escasso registro de casos de malária autóctone no estado do Rio de Janeiro não traduza a inexistência ou raridade da transmissão da doença, mas sim a necessidade de esclarecimento da real magnitude da doença na região. As áreas com elevado potencial turístico e fluxo intenso de pessoas podem estar sujeitas à ocorrência de surtos e, ainda, à re-introdução da malária no estado. Este trabalho pretende contribuir para o esclarecimento dos principais aspectos clínicos e epidemiológicos da malária no estado do Rio de Janeiro.

MARCO TEÓRICO

Aspectos epidemiológicos da malária no Brasil e no mundo

A malária tem ampla distribuição geográfica e é caracterizada como doença febril aguda, não contagiosa, de evolução potencialmente grave quando não tratada oportunamente. Estima-se que em 2012 ocorreram mais de 200 milhões de casos e 41% da população em 104 países estava em risco de adquirir a doença, principalmente nos continentes africano, asiático, americano e Oceania (OMS, 2012).

No continente americano, o Brasil é o país com maior número de casos e atualmente encontra-se em etapa de controle da malária, com níveis de endemicidade baixa ou média, a depender da área, entretanto com alguns focos de incidência elevada (alto risco) concentrados na região Amazônica (OMS, 2012). A situação do país ainda é caracterizada por instabilidade e permanente ameaça de desenvolvimento de surtos epidêmicos, com possível disseminação focal para outras regiões do país, principalmente em decorrência das oscilações no comportamento climático, demográfico e/ou socioeconômico (Pereira-da-Silva & Oliveira, 2002).

A malária é uma doença de notificação compulsória, e mais de 45 milhões de pessoas estão em área de risco no país. Apesar do grande número de casos notificados a cada ano no Brasil, no período de 2000 a 2013, 99,7% dos casos de malária estavam concentrados na Região Amazônica, considerada área endêmica do país, composta pelos estados do Acre (AC), Amazonas (AM), Amapá (AP), Mato Grosso (MS), Pará (PA), Rondônia (RO), Roraima (RR) e parte de Maranhão (MA) e Tocantins (TO). De 2000 até 2013 foram notificados em média 392 mil casos por ano; em 2013 houve um decréscimo no número de notificações quando comparado aos anos anteriores (variando de 615.246 em 2000 a 178.546 em 2013), a maioria dos casos por *Plasmodium vivax* (Pina-Costa et al, submetido).

A região extra-Amazônia é considerada área não endêmica para malária e compreende os estados Alagoas (AL), Bahia (BA), Ceará (CE), Distrito Federal (DF), Espírito Santo (ES), Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), Paraíba (PB), Paraná (PR), Pernambuco (PE), Piauí (PI), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Norte (RN), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), São Paulo (SP) e

Sergipe (SE), além de partes dos estados do Maranhão (MA), Tocantins (TO) e Mato Grosso (MT), a malária relatada nesta região inclui os casos importados, introduzidos e autóctones. Os estados de SP, RJ, GO, PR, MG, ES e PI são os estados da região extra - Amazônia com o maior número de casos notificados no país, dos quais 90% são importados de regiões endêmicas do Brasil e do exterior (PNCM, 2013).

Foram registrados 1.064 casos autóctones na região extra-Amazônica no período de 2007 a 2013. Dos 767 casos registrados em 2013 nesta região, apenas 10,8% (83 casos) foram caracterizados como transmissão autóctone – o que corresponde a apenas 0,05% do total de casos brasileiros; percentual semelhante foi observado em 2012: 10,1% (97 dos 955 casos registrados na extra-Amazônia), correspondendo a 0,04% do total de casos (Pina Costa et al submetido).

Na figura 1 é possível observar as áreas onde ocorre risco de transmissão de malária no Brasil.

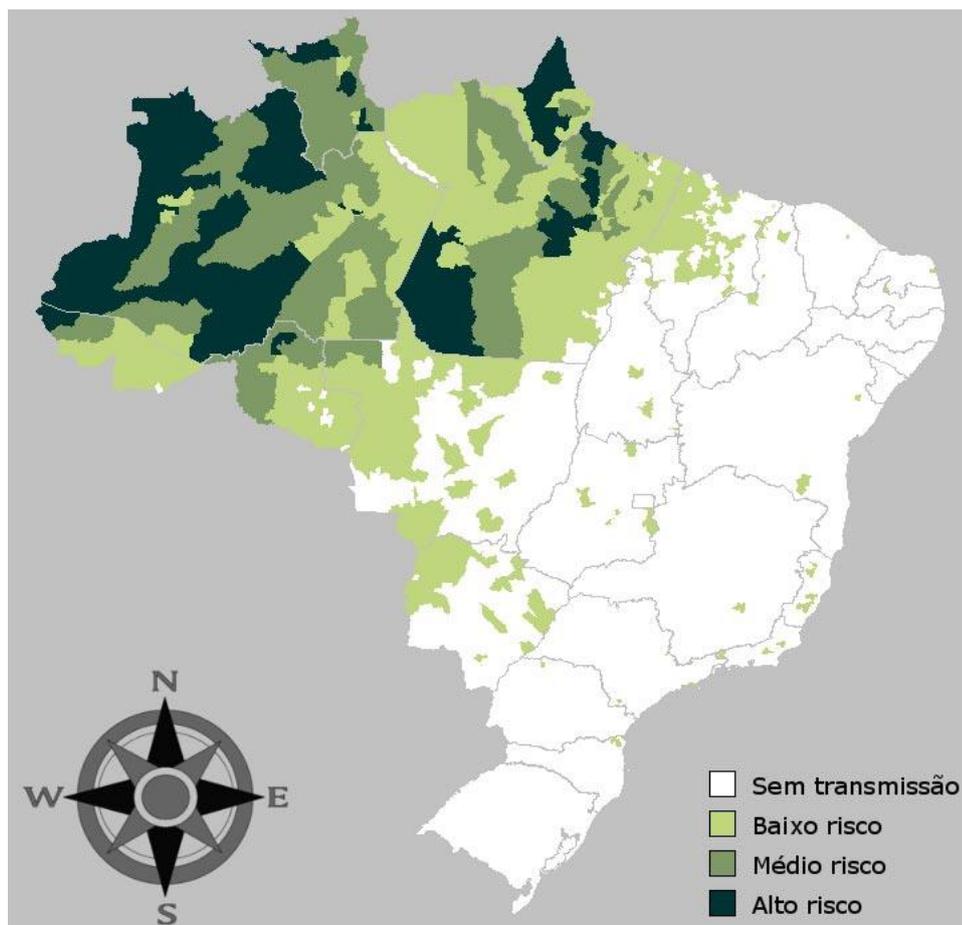


Figura 1- Distribuição dos casos de malária Brasil em 2012.

De acordo com Bértoli & Moitinho (2001): “a malária não se transmite com igual intensidade e rapidez em todas as áreas. Sua dinâmica de transmissão é variável entre os agrupamentos humanos e está na dependência da conjugação de vários fatores”. A autoctonia pode ser definida quando um caso se origina em uma localidade onde exista fonte de infecção (OMS, 1961).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica as áreas malarígenas em endêmicas ou residuais (OMS, 2010). A malária residual no Brasil ocorre em locais onde a transmissão da doença foi interrompida ocorrendo apenas alguns casos esporádicos, como na região extra-Amazônica (Brasil, MS 2013).

Casos autóctones esporádicos usualmente ocorrem em áreas focais, e as áreas de risco para transmissão da malária são determinadas por meio da avaliação do potencial malarígeno que está relacionado com receptividade e vulnerabilidade da área (Brasil, MS 2004b). A receptividade se mantém pela presença, densidade e longevidade do vetor anofelino, e a vulnerabilidade é causada pela presença ou chegada de portadores de plasmódio (Brasil, MS 2004b), humanos ou não. A intensidade da transmissão da malária está diretamente associada à densidade, capacidade e competência vetorial (Cerutti, 2007).

Em regiões não endêmicas, um fator preocupante é o constante trânsito de indivíduos para regiões caracterizadas como receptivas para a transmissão de plasmódios, uma vez que as pessoas ao retornarem aos seus municípios de origem, estes não se encontram estruturados, já que na maioria das vezes dispõe de serviços de vigilância epidemiológica e profissionais pouco preparados para o diagnóstico e controle da malária (Couto, 2009). Essas falhas e o retardo no diagnóstico em regiões com potenciais vetores podem desencadear surtos localizados de malária nessas áreas (Couto, 2010).

A malária no Brasil fora da Amazônia – breve histórico e atualidades

No final do século XIX, a malária estava presente em todo o território nacional, particularmente na costa litorânea (Martins Costa APUD Camargo 2003) e diversos surtos foram documentados, principalmente na região da Serra do Mar (Benchimol e Silva, 2008). Segundo Camargo (2003), no início do século XX, estimativas indicavam

seis milhões de casos de malária por ano no país e a doença estava presente nas grandes capitais, mas sem grandes epidemias; em 1901, Oswaldo Cruz publicou um artigo intitulado “*Contribuição para o estudo dos culicídeos do Rio de Janeiro*”, em que descrevia os focos de malária no então estado da Guanabara, hoje estado do Rio de Janeiro (Cruz O 1901, APUD Miguel R 2011). Fajardo proclamava em 1904: “na cidade do Rio de Janeiro não há impaludismo...”. No entanto, suas próprias observações contradiziam essa assertiva ao confirmar microscopicamente casos de malária oriundos de várias partes do Rio de Janeiro como Ilha do Governador e até da Praça da República, no centro carioca. A realidade é que os casos de malária do Rio eram autóctones e, portanto, a doença estava presente sim na capital da República no início do século XX (Camargo 2003). Entre 1907 e 1908 Arthur Neiva e Carlos Chagas combateram a malária na Baixada Fluminense, região localizada a cerca de 60 km da cidade do Rio de Janeiro. Estudo conduzido na época encontrou mais de quatro mil trabalhadores infectados por *Plasmodium*, em obra realizada para adução dos rios Xerém e Mantiqueira, RJ (Benchimol e Silva, 2008).

Registros históricos atestam que entre os anos de 1829 e 1842 no município de Cachoeiras de Macacu, localizado a cerca de 97 km da capital, houve uma série de casos de uma “febre endêmica”, conhecida na região como “*Febre de Macacu*”, provavelmente causada por *Plasmodium*. A explicação seria as inundações do Rio Macacu, seguida por um longo período de seca quando as águas ficaram paradas nos brejos, o que causou inúmeras mortes e um atraso no desenvolvimento rural da região. Foram documentados três surtos, um em 1829, outro em 1836 e o considerado mais grave no ano de 1842, que culminou com o despovoamento da então Vila de Santo Antônio de Sá (Miguel RB 2011, http://www.macacu.com/macacu/index.php?option=com_content&task=view&id=53&Itemid=52, <http://mapadecultura.rj.gov.br/cachoeiras-de-macacu/ruinas-da-igreja-sao-jose-da-boa-morte/>).

O estado do Rio de Janeiro contava com 56 municípios, vários endêmicos para malária (principalmente na região da baixada fluminense) e quatro espécies de anofelinos eram encontradas naturalmente infectadas: *An. darlingi*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An. bellator* (Carvalho & Rachou 1950 APUD Miguel, 2011).

De acordo com Barros Barreto, em livro publicado em 1940, a malária no estado do RJ ocorria na capital do estado e nos seguintes municípios e localidades em ordem alfabética:

“*Angra dos Reis* (localidades de Bracuí, Estrela e Mambucaba) que além de casos frequentes sofreu uma epidemia em 1926, a custas de *A. cruzii*.

Araruama (localidades de Arapoca, Baía Formosa, Juturnaíba, Mussubaí, Ponte dos Leites, São Vicente de Paula).

Barra do Pirai (localidade de Pirai).

Cabo Frio (Porto do Carro, Palmeiras, Praia do Siqueira, Saco Fora).

Capivari (Caju de Capivari, Capivari, Conceição, Crubixae, Faxina, Gaviões, Lençóis, Serra da Catunga, Serra Queimada).

Iguassú (Andrade de Araújo, Anhangá, Belford Roxo, Caxias, Desvio do Amaral, Eden, Estrela, Fazenda da Posse, Retiro, Figueira, Fragoso, José Bulhões, Mangamga, Painera, Porto da Pedra, Posse, Retiro, Ronco d’Água, Santa Rita, São José, Saruí, Taquara, Tinguá).

Itaboraí (Aldeia Velha, Areal, Bonfim, Cabuçu, Calujo, Coluí, Calundú, Duques, Itaboraí, Itambí, Outeiro das Pedras, Pacheco, Pico, Porto das Caixas, Retiro, Sambaetiba, Tanguá, Venda das Pedras, Vila Nova do Itambí).

Itaguaí (Banal, Coroa Grande, Itaguaí, Ribeirão das Lages).

Macaé (Carapebus, Macaé).

Magé (Banal, Canal, Enconha, Fleixeiras, Floresta, Fragoso, Inhomerim, Iriri, Jororó, Lagoa, Linha de Ferro, Magé, Mundo Novo, Piedade, Porto do Pedro, Raiz da Serra, Saco, Aleixo, Vila Nova).

Mangaratiba (Ibieni, Ingaíba, Ilha Grande, Itacuruçá, Jacareí, Junqueira, Mangaratiba, Muriqui, Patrimônio, Ribeira, Saco, Sai, São Carlos).

Maricá (Araçatuba, Barra, Cajú, Caxita, Engeitado, Imbassaí, Itapeba, Itaocara, Jacaroa, Pindobas, Ponta Grossa, Ponta Negra, Posse, Retiro, Rio Fundo, Saco das Flores, Ubatiba).

Niterói (Charitas, Jurujuba, Morro da Viração, Morro dos Ourives, Piratininga, Ponte Falsa, Preventório, Saco de São Francisco, Samangoiá, Serra de Maracujá).

Parati (Barra Grande, Parati, Tarituba).

Rio Bonito (Rio dos Índios de Dentro).

Sant’Ana de Japuíba (Batatal de Baixo, Cachoeiras, Santana, Subaio).

São João Marcos (Arrosal, Aterrado, Estrada Nova, Mato Dentro, Passa Três, São João Marcos).

Squarema (Bacaxá, Porto da Roça).

Vassouras (Barreira, Belém, Cascata, Ingá, Lages, Mapé, Nilo Peçanha, Paracambi, Quilombo, Sabugo, Serra, Sertão)”.

Os casos ocorriam principalmente entre dezembro e janeiro, com picos em março e abril (Barros Barreto, 1940).

Diversas ações foram implementadas na região com o objetivo de combater a malária, dentre as quais a quinização à força, que esbarrou em forte resistência popular. Uma cápsula de quinino era entregue ao trabalhador e caso ele não a ingerisse era dispensado sumariamente de suas funções (Benchimol e Silva, 2008).

Ainda de acordo com a publicação de Barros Barreto (1940), não existia naquela época relato de malária nos seguintes municípios:

“Barra Mansa, Bom Jardim, Cambuci, Cantagalo, Carmo, Duas Barras, Miracema, Nova Friburgo, Paraíba do Sul, Petrópolis, Resende, Rio Claro, Santa Teresa, Santo Antônio de Pádua, São Sebastião do Alto, Sapucaia, Teresópolis, Trajano de Moraes e Valença”.

A partir das décadas de 60 e 70, com o sucesso da campanha de erradicação da malária os estados da região extra-Amazônica, tiveram suas regiões malarígenas transformadas em áreas de transmissão interrompida. Nessa época estava em voga o processo de tratamento maciço de casos, porém sem eliminação do mosquito transmissor.

Segundo relatos históricos, a malária foi considerada eliminada no estado do RJ em 1968 (Moraes, 1990).

Apesar do grande número de casos notificados no Brasil a cada ano, hoje a parasitose se apresenta como uma doença restrita quase que exclusivamente à região Amazônica, área endêmica do país. Na região extra-Amazônica, a maioria dos casos de malária autóctone ocorre em áreas próximas à Mata Atlântica, descritos de forma sistemática nos estados de SP e ES, com detecção de casos com baixa parasitemia e sintomatologia branda. Existem poucas descrições de casos com transmissão local no estado do Rio de Janeiro, região totalmente inserida no bioma da Mata Atlântica brasileira, área sabidamente com presença de bromélias, local utilizado pelos mosquitos do sub gênero *Kerteszia* como criadouro.

De acordo com Veltri et al (2011), a região Sudeste contribui com aproximadamente 40% dos casos de malária notificados na região extra-Amazônica. Os estados do ES, SP e PR são responsáveis pela maioria dos casos autóctones registrados fora da área endêmica (Brasil MS, 2008a).

Dos 97 casos autóctones registrados no ano de 2012 na região extra-Amazônica, 78 (80,4%) foram adquiridos em áreas de Mata Atlântica. Dos 27 municípios da Mata Atlântica, com casos autóctones registrados em 2012, 19 (70,4%) estavam localizados nos estados de SP, ES, RJ e MG que compõem a região Sudeste, explicando 69 (88,5%) dos casos sob o domínio da Mata Atlântica (Pina Costa et al, submetido).

No estado de SP, a malária autóctone ocorre em duas regiões cobertas por Mata Atlântica, Vale do Ribeira (que abrange 61% da Mata Atlântica brasileira) e Serra do Mar; ocorrem em média 17 casos/ano, em sua maioria por *P. vivax* e suas variantes com baixa contagem de parasitos (Yamasaki et al, 2011). O Vale do Ribeira está localizado no sul do estado de São Paulo e no leste do estado do Paraná.

No estado do ES, os casos autóctones ocorrem na região montanhosa do estado, área coberta por Mata Atlântica. Ocorrem em média 40 casos/ano, em sua maioria por *P. vivax* e suas variantes com baixa contagem de parasitos (Cerutti et al 2007a, Cerutti et al 2007).

Diferente dos outros estados da região extra-Amazônica, em especial os da região sudeste que tem seus casos bem documentados e descritos, no estado do RJ poucos são os relatos de casos de malária. Analisando retrospectivamente após a eliminação da transmissão de malária no estado (1968), há descrição de casos no ano de 1975, durante a construção da Rodovia Rio-Santos, um grupo de trabalhadores provenientes do estado do Maranhão introduziu malária no Sul do estado do RJ, gerando casos na região (Jornal O Globo, 11 de março de 1993). Há uma lacuna de conhecimento acerca dos casos autóctones de malária no estado do Rio de Janeiro nos anos seguintes.

No verão de 1993, casos autóctones, inicialmente entre visitantes do local, foram descritos na região de Nova Friburgo (distritos de: Lumiar, Santa Luzia e Rio Bonito) distante cerca de 130 quilômetros do Rio de Janeiro entre 15 de janeiro e cinco de março de 1993. Após busca ativa, com análise de 150 amostras de sangue de moradores locais, uma criança de 18 meses e um caseiro também foram diagnosticados. Segundo Mattos et al 1993, um total de sete casos de malária foram diagnosticados na região, todos referidos como autóctones. Todos apresentavam infecção por *P. vivax* e baixa contagem de parasitos. Até esta data, não existiam publicados relatos de casos de malária na região (Mattos et al, 1993). Estudo conduzido por Azevedo (1997) encontrou prevalência de 35,4% e 47,8% de IgG anti *P. vivax* em amostras de residentes na região nos anos de 1996 e 1993 respectivamente.

Em 1997, na localidade de Itaipuaçu (Maricá), distante aproximadamente 30 quilômetros da cidade do Rio de Janeiro, foram confirmados três casos de malária em uma região considerada de alta densidade para *An. aquasalis* (Carreira-Alves, 2001), sem referências para o tipo de transmissão.

Há relatos em mídia eletrônica de doze casos de malária autóctone na localidade de Lumiar, município de Nova Friburgo, no período de 2003 a 2010 (sendo três em 2003, um em 2005, dois em 2006, dois em 2007, dois em 2008 e dois em 2010) (Disponível em <http://www.avozdaserra.com.br/noticias.php?noticia=2135>), laboratorialmente identificados como *P. vivax* com parasitemias variando de menos de 1/2 cruz a uma cruz (um caso com menos de 1/2 cruz, três casos com 1/2 cruz e um caso

com uma cruz). Todos os casos eram sintomáticos (Veltri et al, 2011).

Em recente estudo conduzido por Miguel (2011), no município de Guapimirim, 324 habitantes foram submetidos a exames moleculares, sorológicos e parasitológicos. A prevalência de exame molecular positivo (PCR) foi de 2,8%, (nove indivíduos assintomáticos com presença de DNA plasmodial); já na sorologia 3,5% das amostras foram positivas para anticorpos IgG anti *P. falciparum* e 7,7% para IgG anti *P. vivax*. Apenas um exame parasitológico direto (gota espessa) foi positivo para *Plasmodium* spp. Observou-se que o ingresso na mata foi considerado comportamento de risco para infecção (Miguel, 2011).

O escasso registro de casos de malária autóctone no estado do Rio de Janeiro não traduz a inexistência ou raridade da transmissão da doença, mas a necessidade de esclarecimento da dinâmica de transmissão e da real magnitude da doença na região. Sabe-se que a malária foi endêmica no estado do RJ no passado, entretanto esses casos eram descritos em áreas distintas dos locais em que a maioria dos casos ocorre atualmente. Até o momento existe uma lacuna de conhecimento referente aos mecanismos de transmissão e das formas de apresentação clínica da malária adquirida na região de Mata Atlântica, que parecem ser diferentes da Região Amazônica. Atualmente, vincula-se que a malária na Mata Atlântica seria uma zoonose e não uma antroponose como ocorre nas regiões endêmicas.

A descrição de malária autóctone no estado do RJ ocorre principalmente na região de Nova Friburgo, especificamente na localidade de Lumiar, desde o início da década de 1990. Vincula-se que a presença de madeireiras na região com material proveniente de estados endêmicos, associada ao trânsito constante de indivíduos também provenientes da Amazônia poderia ser a explicação para a manutenção da transmissão na região (Pina Costa et al, submetido).

A Mata Atlântica brasileira e o estado do Rio de Janeiro

A Mata Atlântica e seus ecossistemas associados corresponde a cerca de 15% do território nacional, englobando 17 estados (AL, BA, CE, ES, GO, MG, MS, MT, PB, PE, PI, PR, RJ, RN, RS, SC, SE e SP), e se distribui em faixas litorâneas, florestas de baixada, matas interioranas, com consideráveis diferenças de altitude, que produzem grande variedade de clima, temperatura e solo, o que potencializa sua diversidade

biológica. Nessas regiões vivem cerca de 110 milhões de pessoas, totalizando aproximadamente 62% da população brasileira (Fundação S.O.S. Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2009).

Estima-se que anteriormente à chegada dos europeus, o estado do RJ possuía uma área florestada que cobria cerca de 97% do seu território. Em 500 anos, os diferentes ciclos econômicos baseados essencialmente na exploração de recursos naturais acarretaram enorme perda da área de Mata Atlântica. Hoje o estado do RJ apresenta a cobertura florestal variando entre 19,6% e 20,3%, dependendo da referência utilizada (Fundação S.O.S. Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais 2009, Fidalgo et al 2009). O estado está totalmente inserido no bioma da Mata Atlântica, tem uma população de 15.993.583 habitantes em uma área de 43.780 Km², dividido em 92 municípios. Possui oito diferentes regiões: baixadas litorâneas, centro-sul fluminense, costa verde, médio Paraíba, metropolitana, noroeste fluminense, norte fluminense e serrana (Bastos & Napoleão, 2011). Seu território limita-se a norte e nordeste com o estado do ES; a norte e noroeste com o estado de Minas Gerais e, a oeste com o estado de SP. Ao leste, sudeste e sul confronta-se com o Oceano Atlântico por uma extensão de 636 quilômetros. É um dos menores estados da Federação superando apenas SE, AL e o DF.

No estado do RJ existem duas áreas estratégicas para conservação da Mata Atlântica: o Corredor da Serra do Mar (perpassando o litoral de SP, SC, PR e RJ) e o Corredor Central (unindo as florestas do sul da BA e norte do ES).

O Corredor da Serra do Mar abrange a Serra dos Órgãos, trecho mais elevado, localizado na região central do estado do RJ, que é uma das áreas mais ricas em biodiversidade, apontada pelo Ministério do Meio Ambiente como uma das cinco áreas de extrema relevância para conservação na Mata Atlântica no país (Lei 9985/2000). O corredor da Serra do Mar abriga mais de 2.800 espécies de plantas, com destaque para mais de 100 espécies de bromélias (<http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos/>). Na Serra dos Órgãos encontra-se o Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) inserido ao longo dos municípios de Teresópolis, Petrópolis, Magé e Guapimirim. O parque conta com mais de 20.000 hectares, relevo bastante acidentado com variação altitudinal de 80m a 2.263m (<http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos/>); o clima é tropical superúmido (80 a 90% de umidade relativa do ar) com temperatura média

anual variando de 13° a 23° C (atingindo valores de 38°C na parte mais baixa até 5°C negativos nas partes mais altas) e variação pluviométrica de 1.700 a 3.600mm, com concentração de chuvas no verão (dezembro a março) e período de seca no inverno (junho a agosto).

O ecossistema na região da Mata Atlântica do estado do RJ com existência abundante de bromélias, de *An Kerteszia cruzii* e a provável presença de macacos *bugios* da espécie *Alouatta*, e a detecção de malária em indivíduos que entraram em área de mata descritos neste estudo, são indícios de que pode haver casos de malária não diagnosticados e infecção assintomática na região.

O agente etiológico

Para que a malária ocorra naturalmente é necessária à interação de três elementos: o protozoário do gênero *Plasmodium*, o vetor anofelino (mosquito do gênero *Anopheles*) e o hospedeiro. Segundo a maioria dos autores, o homem é o principal reservatório com importância epidemiológica, e os agentes etiológicos da malária humana são protozoários do filo Apicomplexa, classe Sporozoa, família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*. As espécies presentes no Brasil são *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890, Labbé, 1889) - que representa 82% dos casos registrados (Pina Costa et al, submetido), *Plasmodium falciparum* (Welch 1897; Schaudinn 1902) - aproximadamente 16,5% dos casos, e *Plasmodium malariae* (Laveran 1881; Grassi & Feletti 1890) - uma pequena percentagem dos casos. Os demais casos no país são em decorrência de infecção mista (2%). Raramente ocorrem casos por *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) que, neste caso, são importados de países africanos (não há registros de transmissão autóctone dessa espécie no Brasil) (Brasil, 2008b).

Existem ainda diversas outras espécies de plasmódios que causam infecção em símios, e que em condições especiais também podem ser capazes de infectar o homem, como: *P. cynomolgi*, *P. simium* (Fonseca, 1939), *P. brasilianum* (Gonder & Berenberg-Gossler, 1908), *P. eylesi*, *P. knowlesi* (Franchini, 1927), *P. schwetzi* (Warrell & Gilles, 2002) e *P.inui* (Ta et al, 2014).

Plasmodium cynomolgi, *P. knowlesi*, *P.inui* e *P. eylesi* estão distribuídos na Ásia e África, *P. schwetzi* é encontrado na África e *P. brasilianum* e *P. simium* no Novo Mundo (Ta et al, 2014).

Segundo Ta et al (2014), embora transmissão natural de uma espécie de plasmódio não-humano para humanos até recentemente era considerada rara, em 2004 confirmou-se infecção humana por *P. knowlesi*, na Malásia e sudoeste da Ásia, (Singh et al, 2008). O *P. knowlesi* era considerado um parasito com transmissão apenas entre os primatas do Velho Mundo. Inicialmente, entre humanos, foi confundido em exame direto com *P. malariae*, contudo, atualmente já é considerado por muitos como a quinta espécie de plasmódio capaz de infectar o homem, sendo reconhecido apenas por meio de exame molecular (Cox-Singh et al, 2008). Até o momento não há registro de casos autóctones ou importados por essa espécie de *Plasmodium* diagnosticados no Brasil.

Em 2014, também na Malásia, Ta et al (2014) descreveram o primeiro caso de infecção humana adquirida de forma natural por *P. cynomolgi*, que infecta naturalmente macacos do Velho Mundo, na África e sudeste da Ásia. O *P. cynomolgi* é morfologicamente indistinguível de *P. vivax*, e o protocolo de diagnóstico molecular mais utilizado no mundo (Snounou et al 1993) amplifica inespecificamente esse parasito como *P. vivax* (possivelmente porque o gene 18srRNA é uma região conservada entre essas espécies). Logo, para correta identificação desse parasito é necessário outro protocolo de diagnóstico que amplifique outro alvo (Ta et al, 2014).

De acordo com Yamasaki (2011), são conhecidas vinte espécies de plasmódios que infectam primatas não humanos. A infecção entre símios já é descrita há vários anos no Brasil; a malária como zoonose foi estudada de forma mais profunda por Dr. Leônidas Deane, um dos mais importantes malariologistas brasileiros. No Brasil, estão implicados nesta dinâmica *P. simium* e *P. brasilianum* (Ta et al, 2014).

Plasmodium simium, foi descrito pela primeira vez por Fonseca em 1939, em uma gota espessa de um símio *Allouatta fusca* durante estudos sobre febre amarela no Brasil (Deane, 1969).

De acordo com Deane (1969):

“Embora *P. simium* (morfologicamente e biologicamente indistinguível do *P. vivax*) e *P. brasilianum* (também morfologicamente e biologicamente indistinguível do *P. malariae*) sejam infectantes tanto para o homem quanto para os símios, seus ciclos de transmissão são na maioria das vezes independentes.”

Goldman et al (1993) APUD Lourenço de Oliveira & Deane (1995) salientam que *P. simium* poderia ser uma cepa de *P. vivax*. Em estudo conduzido por Lim et al 2005, usando duas cepas de *P. simium* de origem brasileira, demonstraram que as sequências da proteína de superfície de circunsporozoíta (CSP) de *P. simium* são geneticamente indistinguíveis das 24 cepas estudadas de *P. vivax*. Escalante et al (1995), observaram identidade genética entre *P. vivax* e *P. simium* na CSP e concluíram que a transferência entre os humanos e os macacos do Novo Mundo ocorreu recentemente na escala evolutiva. A indistinção genética das duas espécies foi confirmada em 13 loci microssatélites e oito repetições em tandem (Lim et al, 2005). Os dados indicam que, além disso, a transferência entre humanos e macacos deve ter ocorrido duas vezes, porque ambos os tipos variantes (VK 210 e VK 247) estão presentes em ambas as espécies (Lim et al, 2005). A resposta imunológica também seria idêntica (Duarte et al, 2006).

Segundo Cochrane et al (1990) e Fandeur et al (2000) APUD Cerutti (2007a) o *P. brasilianum* é considerado a mesma espécie que o *P. malariae* por causa de semelhanças moleculares encontradas nas duas espécies. Em hospedeiros naturais, *P. brasilianum* apresenta baixa parasitemia e em muitos casos infecções inaparentes (Yamasaki, 2011); suas formas sanguíneas são indistinguíveis e, imunologicamente, os anticorpos contra esses dois parasitos (*P. brasilianum* e *P. malariae*) apresentam reações cruzadas (Deane 1969, Yamasaki 2011).

Uma questão levantada é a caracterização de malária como uma zoonose em locais onde o mosquito vetor pica tanto próximo da copa das árvores quanto próximo ao solo, como o faz o *Anopheles (ker) cruzii* em algumas regiões, alimentando-se tanto ao nível do solo quanto ao nível da copa das árvores (Ueno et al, 2007).

A figura 2 mostra um esquema hipotético de transmissão da malária simiana ao ser humano.

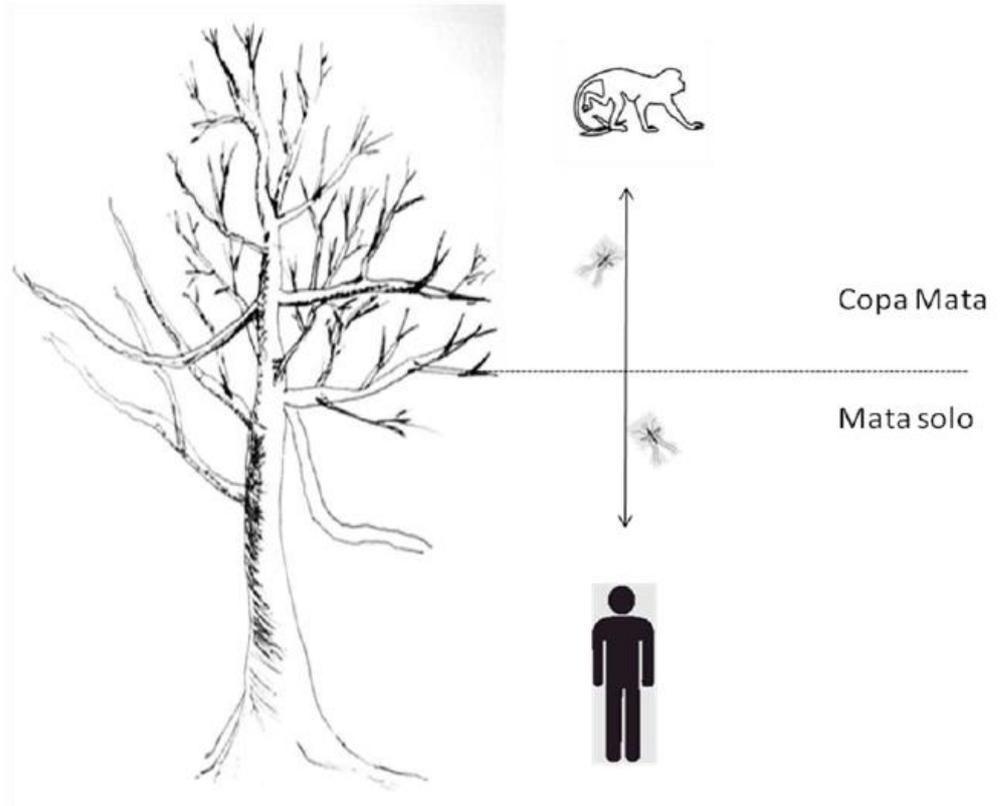


Figura 2- Ilustração hipotética da transmissão da malária simiana a humanos. O vetor se apresenta com dispersão vertical entre e o solo e a copa das árvores.

Fonte: Yamasaki T, 2011. Detecção dos agentes etiológicos da malária em símios resgatados em áreas de Mata Atlântica no estado de São Paulo, pág 09.

Na década de 1990, Dr Deane (Deane LM, 1992) descreveu:

“Apesar das altas taxas de primatas infectados, não existem evidências da relação entre malária simiana e malária humana nas regiões Sudeste e Sul, onde a malária humana foi erradicada. Já na região Amazônica, estudos sorológicos tem revelado alta positividade de anticorpos para *P. brasilianum* / *P. malariae* na população local, o que pode sugerir a transmissão da malária num contexto de zoonose nessas regiões”.

Os estudos de Deane (Deane et al 1969) em de diferentes regiões do Brasil (AM, ES, SP, SC, RS) mostraram símios da família *Cebidae* naturalmente infectados por *P. brasilianum*, com uma prevalência acima de 52% para a espécie *Alloutta fusca* (bugio ou barbado), 42% para *Lagothrix cana* (macaco barrigudo), acima de 33% para a espécie *Ateles paniscus chamek* (coatá de cara preta), 25% para a espécie *Lagothrix lagotrincha* (macaco barrigudo), e acima de 16% para *Alouatta seniculus straminea* (guariba vermelho). Ao estudar a família *Callithricidae* (marmosets) nenhum animal apresentava plasmódios em suas amostras de sangue. Não foram incluídos neste estudo primatas do estado do RJ, contudo foram encontrados primatas com amostras positivas para *P. simium* e *P. brasilianum* em *Alloutta fusca* em estados vizinhos, como SP e ES. As frequências de infecção para *P. simium* em *Alloutta fusca* foram: 29,9%, 25,4% e 13,3% nos estados de SP, SC e RS respectivamente (Deane et al, 1969).

Em pesquisa conduzida por Duarte et al (2008), 448 amostras de macacos selvagens que vivem em áreas com descrição de casos autóctones de malária foram estudadas. Cento e quarenta amostras provenientes da região de Mata Atlântica brasileira foram testadas por PCR multiplex, gota espessa e distensão sanguínea. A frequência das infecções por *Plasmodium* detectados por PCR em *Alouatta guariba clamitans* na Mata Atlântica de SP foi de 11,3% (5,6% para o *P. malariae* e 5,6% para o *P. vivax*), e uma amostra foi positiva para *P. falciparum* (1,4%). Nenhum exame direto foi positivo. Os autores salientam que a prevalência parasitológica de *P. vivax* e *P. malariae* em macacos selvagens da Mata Atlântica e o achado de um resultado positivo para *P. falciparum* reforçam a hipótese de que os macacos pertencentes a este gênero podem ser um reservatório potencial de *Plasmodium* em áreas com transmissão autóctone.

Em recente estudo conduzido por Araújo et al (2013) no estado de RR, foram examinadas 184 amostras de primatas das famílias *Callitrichidae*, *Cebidae*, *Aotidae*, *Pitheciidae* e *Atelidae*. Através de métodos moleculares (PCR e sequenciamento) foram encontradas 18 amostras de animais infectados com *P. brasilianum* (10%) e de forma inédita no país, *P. falciparum* em quatro animais (2%), além de dois animais com infecção mista (*P. falciparum* e *P. brasilianum*). Em consonância com os estudos de Deane, em nenhum animal foi encontrada infecção por *P. vivax*/*P. simium* na região Amazônica.

Das espécies encontradas no Brasil, *P. brasilianum* tem uma vasta distribuição geográfica, sendo encontrado na floresta Amazônica e na Mata Atlântica infectando todos os gêneros das famílias *Cebidae* e *Atelidae*, exceto *Aotus* (Duarte et al 2008, Curotto et al 2012). Já o *P. simium* foi encontrado em uma área muito mais restrita, apenas em regiões de Mata Atlântica do Sul e Sudeste Brasileiro, infectando apenas macacos do gênero *Alouatta* e *Brachyteles* (Deane et al 1992).

Sabe-se que o ciclo de vida dos plasmódios simianos é muito semelhante a dos plasmódios humanos e que algumas infecções desaparecem dentro de poucos meses, mas outras podem persistir por vários anos (Yamasaki, 2011). Geralmente, a maioria dos animais apresenta baixa parasitemia, esporadicamente febre e curam-se espontaneamente (Deane 1992). Entretanto, diferente do Dr Deane, Hastings et al (2003) sugerem que a infecção em hospedeiros naturais poderia ser crônica.

O ciclo biológico do parasito no homem

O ciclo biológico dos parasitos da malária humana compreende uma fase de reprodução sexuada que ocorre dentro do hospedeiro invertebrado (vetor), e outra de reprodução assexuada que se desenvolve no hospedeiro vertebrado. Durante o repasto sanguíneo a fêmea do mosquito infectado deposita esporozoítos sob a pele. Em cada picada são depositados em média 100 esporozoítos (Jin et al 2007), os quais circulam na corrente sanguínea por alguns minutos e penetram nos hepatócitos. O processo de invasão dos hepatócitos é complexo e depende de várias interações do tipo ligante-receptor (Sanchez 2011). Inicia-se o ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia tecidual que dura em média seis dias para *P. falciparum*, oito dias para *P. vivax* e 12 a 15 dias para

P. malariae. Durante este processo, nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitos se desenvolvem rapidamente nos hepatócitos, enquanto outros, os responsáveis pelos casos de recaídas, permanecem em estado de latência no fígado, sendo assim denominados de hipnozoítos (Krotoski et al 1982). Uma vez dentro dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que após sofrerem várias divisões por esquizogonia formam os esquizontes. Estes esquizontes rompem o hepatócito, liberando milhares de merozoítos na corrente sanguínea. Cada hepatócito rompido libera em média 2.000 merozoítos em infecção por *P.malariae*, 10.000 em infecção por *P.vivax*, e 40.000 em infecção por *P. falciparum*. Esses merozoítos teciduais invadem as hemácias iniciando assim a fase eritrocítica. *P.malariae* só invade hemácias velhas, *P.vivax* preferencialmente hemácias jovens e *P.falciparum* hemácias em qualquer fase evolutiva (Brasil, MS 2009). Para que o merozoíto invada a hemácia é necessário que haja também o reconhecimento inicial de receptores específicos (Barnewell & Galinski 1998). Esse processo de invasão é complexo, sendo mediado por interações moleculares específicas do tipo ligante receptor. No caso do *P. vivax*, a invasão é altamente dependente do antígeno de grupo sanguíneo Duffy (DARC) presente na superfície dos eritrócitos, que interage com uma proteína do parasito, a Duffy binding protein (PvDBP) (Sanchez 2011).

Após invadir as hemácias, durante um período que varia de 48 a 72 horas, na dependência da espécie plasmodial (48 horas para *P.vivax* e *P.falciparum* e 72 horas para *P.malariae*) o parasito desenvolve-se até provocar sua ruptura, liberando novos merozoítos que irão invadir novas hemácias. A ruptura e consequente liberação de parasitos na corrente sanguínea dá início ao paroxismo malárico (início dos sinais e sintomas) (Brasil, MS 2009).

Através de mecanismos pouco esclarecidos, alguns merozoítos sanguíneos se diferenciam dando origem a formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos, os quais amadurecem sem sofrer divisão celular. Ao serem ingeridos pela fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo, inicia-se o ciclo sexuado ou esporogônico (Brasil, MS 2009).

A proteína de superfície de circunsporozoíta (CSP) é o polipeptídeo mais abundante presente na cobertura de esporozoítos. Esta proteína está envolvida na motilidade e invasão do esporozoíto durante sua entrada no hepatócito (Souza-Neiras et al, 2010). No caso do *P. vivax*, a espécie plasmodial com maior número de casos nas Américas, variações no gene da proteína CSP foram descritos em estudos realizados nas

últimas décadas (Rosenberg et al 1989, Kain et al 1991, Lim et al 2005, Souza-Neiras et al 2010). A primeira variante sequenciada e que se caracteriza pela presença de um nonapeptídeo repetido em *tandem* no domínio central da proteína, foi denominada VK210, considerada a forma clássica de *P.vivax*.

Em cepas da Tailândia, foram descritas variações neste mesmo nonapeptídeo, sendo essa variante conhecida como VK247 (Rosenberg et al, 1989). Em cepas de Papua Nova Guiné, foi descrita a existência da variante *P. vivax-like*, assim denominada por ser morfológicamente semelhante ao *P.vivax*, mas por diferir na sequência repetitiva da região central da CSP. Esta variante apresenta total identidade com o *P.simiovale*, parasito de primatas, originalmente identificado no Sri Lanka. Possivelmente este parasito circula de forma independente nos dois hospedeiros.

As três variantes têm sido demonstradas em diferentes partes do mundo (Kain et al 1991, Souza-Neiras et al, 2010). No Brasil, a ocorrência dos três genótipos é descrita por diferentes autores (Machado & Póvoa 2000, Storti-Melo et al 2009). Estudos sugerem que o genótipo VK 210 é a variante melhor adaptada em todo mundo (Machado & Póvoa 2000).

Alguns pesquisadores propõem que essa diferença na proteína CSP poderia interferir na intensidade de transmissão, competência vetorial, resposta imune e ao tratamento e resistência às drogas disponíveis para a cura (Machado & Póvoa 2000, Storti-Melo et al 2009, Souza-Neiras et al 2010).

O vetor e a transmissão

A malária naturalmente adquirida é transmitida por mosquitos fêmeas infectadas e infectantes da ordem dos dípteros, da família Culicidae e do gênero *Anopheles*. No Brasil, o principal vetor da região Amazônica é o *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* que é reconhecidamente antropofílico e tem como criadouro grandes coleções de água limpa e parada (Deane 1986, Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994, Cerutti 2007).

Na região extra-Amazônica são considerados vetores da malária além do *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*: *An. (Kerteszia) bellator* e *An. (Kerteszia) cruzii*, incriminados na transmissão da malária de bromélia e *An. (Nyssorhynchus) aquasalis* (criam-se em águas salobras) e *An. (Nyssorhynchus) albitarsis* (criam-se nos mais

variados tipos de coleções líquidas, temporárias ou não, naturais e artificiais, expostas à luz ou sombreadas) (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). A maioria das espécies de *Kerteszia* é encontrada em regiões costeiras (oceanos Pacífico e Atlântico), com registro da presença de *An. cruzii*, *An. bellator*, *An. homunculus*, *An. bambusicolus* and *An. laneanus* (Zavortink 1973 APUD Marelli et al 2007). Dessas espécies, apenas *An. cruzii* e *An. bellator* apresentam importância epidemiológica.

Segundo Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994:

“O gênero *Kerteszia* cria-se em bromélias preferindo as situadas em locais protegidos dos raios solares, ou seja, na sombra produzida pelas copas das árvores. É também encontrado, porém em menor frequência, em gravatás rupestres e/ou expostos ao sol, sendo abundante dentro de matas úmidas das encostas litorâneas. Pica durante o dia e a noite, com forte aumento da atividade hematofágica no crepúsculo vespertino e nas primeiras horas da noite, ataca o homem e outros mamíferos; a presença de uma fonte sanguínea torna-o imediatamente excitado, independentemente do horário ou do tipo de hospedeiro.”

O *An. cruzii* é o único vetor natural conhecido de malária simiana no Brasil e nas Américas, veiculando os dois plasmódios de macacos do Novo Mundo — o *P. brasilianum* e o *P. simium* — ambos infectantes para o homem (Deane et al 1970, Rona et al 2010). São mosquitos vorazes que picam durante as 24 horas do dia (com picos crepusculares) (Branquinho et al, 1997). Esta espécie que pertence ao subgênero *Kerteszia*, é encontrada ao longo de toda a Mata Atlântica brasileira, desde o litoral do RS até SE (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Esta floresta fornece um ambiente excelente para *An. cruzii*, uma vez que é um ecossistema abundante em bromélias. A “*bromélia-malária*” ou “malária de bromélias” é assim chamada devido à associação de sua ocorrência com matas ricas neste tipo de vegetal (Ueno et al, 2007) que proporcionam um excelente ambiente para as espécies de *Kerteszia*, que sabidamente se utilizam dessas plantas para seu criadouro e *habitat* larval (Marelli et al, 2007).

De acordo com Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), o *An. bellator* é encontrado apenas no litoral, e seus hábitos são muito semelhantes aos do *An. cruzii* e de outros *Kerteszia*. Prefere criar-se em bromélias mais expostas ao sol e aquelas maiores que permitem o acúmulo de maior quantidade de água nas axilas de suas folhas. Tem hábito essencialmente crepuscular vespertino, prolongando sua atividade

hematofágica às primeiras horas da noite, atacando o homem de maneira surpreendente, e em elevado número, ao pôr-do-sol.

Estudos apontam que áreas com presença de espécies de *Kerteszia* são consideradas de risco para a transmissão de *Plasmodium* (Marelli et al, 2007). Essas áreas de Mata Atlântica usualmente apresentam clima úmido e chuvoso. (Ueno et al (2007) apontam que a correlação entre chuva e densidade de mosquitos possivelmente existe, entretanto merece ser mais bem investigada.

Em menor intensidade, mas também considerados vetores da malária na região, o *An. (Nyssorhynchus) aquasalis*, que prefere águas dotadas de certa salinidade, podendo também ser encontrado em localidades distantes do litoral, sempre quando o solo é rico em cloretos, e sua densidade populacional é diretamente influenciada pela presença de chuvas, característica imposta pela relativa transitoriedade de seus criadouros, sendo mais raro em épocas de mais seca (podendo quase desaparecer no final desta estação) e ser altamente abundante quando iniciam ou finalizam os meses chuvosos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). É considerado vetor primário da malária nas zonas áridas do Nordeste, na Amazônia (no PA (Belém) e AP), além de já ter sido detectado com infecção natural nos estados do RJ e SP (Galvão et al 1942; Deane et al 1948; Rachou, 1958 APUD Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

O *An. (Nyssorhynchus) albitarsis* é comumente encontrado picando durante todo o ano nas áreas de planície, baixada e planalto, e é raro à medida que se avança para terrenos com forte declive ou para dentro das florestas. Cria-se nos mais variados tipos de coleções líquidas, temporárias ou não, naturais e artificiais, expostas à luz ou sombreadas. Contudo, suas larvas são mais abundantes nos alagados com capim (campos ou pastagens), de água doce e limpa, que se formam nos descampados, de forma que os criadouros são ensolarados, mas com a luz solar um pouco abrandada pela vegetação emergente. É considerado um vetor secundário ou no máximo local, visto que em poucas localidades foi encarado como o único transmissor (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Em trabalho conduzido pelo Centro de Estudos e Pesquisa em Antropozoonoses do estado do RJ, exposto no I Encontro macrorregional de malária do Rio de Janeiro em 2009, foram apresentados os mapas com a distribuição dos anofelinos no estado. Nos municípios de Cachoeiras de Macacu, Nova Friburgo e Teresópolis não foram encontrados *Anopheles (Nys) darlingi* e *Anopheles (Nys) aquasalis*. Nos dois últimos municípios citados, também não foi encontrado *Anopheles (Nys) albitarsis*. O

Anopheles (Ker) bellator não foi encontrado nos municípios de Cachoeiras de Macacu, Macaé e Guapimirim. Já o *Anopheles (Ker) cruzii* não foi encontrado nos municípios de Guapimirim, Macaé e Cachoeiras de Macacu.

A figura 3 apresenta os municípios com presença de *Anopheles (Nys) darlingi*, *Anopheles (Nys) albitarsis*, *Anopheles (Nys) aquasalis* e *Anopheles (Ker) bellator*. A figura 4 apresenta os municípios com presença de *Anopheles (Ker) cruzii*.

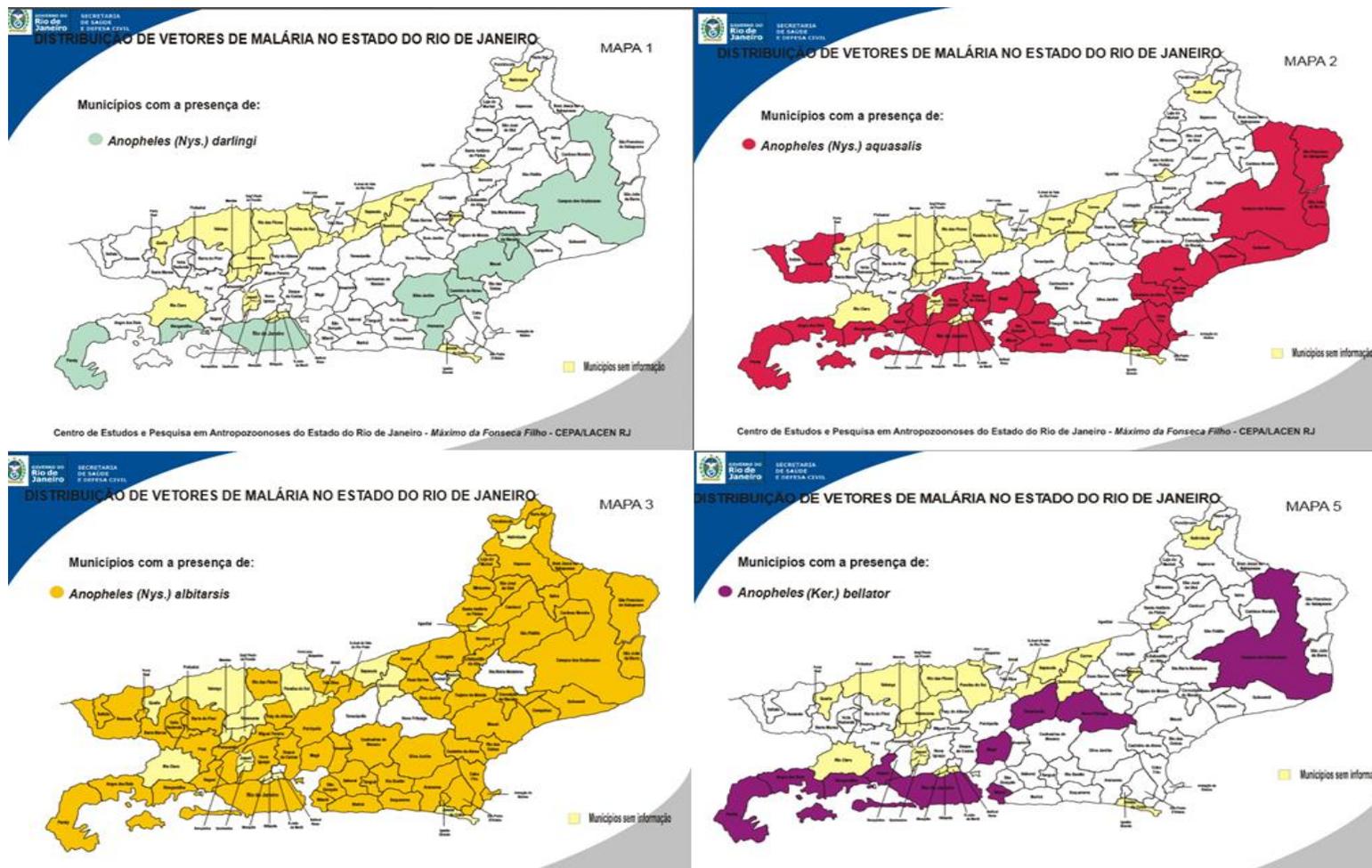


Figura 3 – Distribuição de vetores de malária no estado do Rio de Janeiro. Fonte: Centro de Estudos e Pesquisa em Antropozoonoses do estado do Rio de Janeiro, Secretária Estadual de Saúde, RJ. A cor amarela no mapa se refere aos municípios sem informação.

Além da transmissão natural da malária através do vetor, também pode ocorrer transmissão a partir de hemoderivados (plasma fresco, concentrados de hemácias, de leucócitos e de plaquetas (Wells & Ala 1985, Dover & Guinee 1971, Garfield et al, 1978)). Esse tipo de transmissão (Saez-Alquézar et al, 1998) não é incomum no Brasil e ocorre geralmente através de doadores assintomáticos ou com baixas parasitemias (Martins, 1993 apud Torres-Silva, 1999, Scuracchio P et al 2011).

No Brasil, a real incidência da malária transfusional é desconhecida, e este evento pode estar contribuindo para uma provável transmissão da doença em regiões onde a triagem sanguínea talvez não esteja sendo feita de maneira rigorosa. Colabora com estes dois fatores, a desinformação nos bancos de sangue e dos profissionais de saúde em relação à distribuição geográfica da malária podendo determinar equívocos na realização da triagem epidemiológica (Couto, 2008). Como essa triagem não exclui indivíduos que residem em área de Mata Atlântica ou próximos a ela, é possível que indivíduos oligossintomáticos ou assintomáticos doem sangue e transmitam malária para receptores imunocompetentes ou não, o que pode cursar com uma infecção leve ou até óbito, como já descrito por Kirchgatter et al 2005, Scuracchio et al 2011.

Pouco frequente, mas bem documentados são surtos de malária com transmissão por uso compartilhado de seringas (Shin Shiang et al, 1991) e por acidente com materiais perfuro cortantes (Kow-Tong et al, 1999), o que caracteriza uma transmissão induzida, além de transmissão congênita, que se efetiva pela mistura do sangue materno com o fetal (McDermott et al, 1996).

A Doença e o Diagnóstico

A malária pode se manifestar como uma infecção leve, moderada, grave ou gravíssima, na dependência da espécie que causa a doença e da imunidade prévia do indivíduo parasitado e do tempo entre o início dos sintomas e diagnóstico.

Classicamente, os sintomas envolvem a tríade clássica: calafrio, febre e sudorese. A fase sintomática inicial geralmente precede a clássica febre da malária, e é caracterizada por mal estar, cefaléia, náuseas, tonturas, cansaço, mialgia, artralgia, sintomas comuns à maioria das doenças febris agudas.

O ataque paroxístico inicia-se com calafrio que dura de 15 minutos à uma hora, sendo seguido por fase febril com temperatura corpórea podendo atingir 40°C ou mais. Após um período de duas a seis horas, ocorre redução da febre e o paciente apresenta sudorese profusa e fraqueza intensa. Segue-se um período de ausência dos sintomas com sensação indefinida de bem estar e certo grau de prostração. Após essa fase inicial, a febre assume caráter intermitente, dependendo do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio. A febre está relacionada com a liberação de merozoítos no sangue pelas hemácias rompidas ao final da esquizogonia sanguínea; a cada 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax*, o que caracteriza a chamada malária terçã, e a cada 72 horas para *P. malariae* o que caracteriza a malária quartã. Nem sempre o quadro febril se apresenta com padrão regular classicamente descrito, inicialmente porque são necessários vários ciclos para alcançar a sincronia, e posteriormente a sincronia se perde quando ocorre o sequestro eritrocitário, como ocorre no caso do *P. falciparum*. Além disso, em alguns casos, o indivíduo recebe mais de uma picada infectante com inoculação de esporozoítos em diferentes oportunidades, o que pode descaracterizar a intermitência dos sintomas, pois o indivíduo pode ter parasitos em diferentes etapas evolutivas.

Barros Barreto em 1940 ao citar o prestigiado médico Miguel Pereira descreveu os prodrômos da malária como: “sensações vagas e erráticas (...) resumidas todas no indefinível mal estar qua a cada indivíduo provoca (...) sempre com a mesma queixa: ***não sei o que tenho, mas não me sinto bem...***”

Prossegue descrevendo o quadro clínico:

“... pequenas horripilações, dores inexpressivas, inexplicável lassidão, irritabilidade, incapacidade de trabalho, diminuição do apetite, torpor digestivo, acrimonia do humor ... e uma sensação muito especial experimentada pelo paciente, como se lhe corresse água fria pelas costas...” Barros Barreto, 1940

A infecção por *P. vivax* é usualmente reconhecida na literatura como uma doença benigna que cursa com sintomas brandos e baixa parasitemia, em comparação com o *P. falciparum* (Daniel-Ribeiro et al, 2008), porém nos últimos anos, casos graves de malária por *P. vivax* têm sido relatados em várias partes do mundo, incluindo a região Amazônica brasileira, sem que os mecanismos fisiopatogênicos desses casos complicados/graves por *P. vivax* sejam conhecidos. Pouco se sabe sobre a capacidade de

P. vivax induzir formas clínicas graves, contudo já se demonstrou *in vitro* sua capacidade de formação de rosetas a partir de hemácias parasitadas e não parasitadas, o que é classicamente descrito para *P. falciparum* (Udomsanpetch, 1995 APUD Guimarães de Lacerda, 2007). Além das formas graves e não graves, há formas intermediárias de infecção por *P. vivax* que não se caracterizam rigorosamente como formas graves, pela ausência de citoaderência, mas que fogem ao comportamento habitual das formas clínicas não graves classicamente observados no Brasil (Guimarães de Lacerda, 2007).

Os casos de malária complicada por *P. vivax* até o momento descritos estão especialmente associados à primo infecção (Alecrim, 2000 apud Suárez-Mutis et al, 2005). Um dos eventos de malária complicada mais frequentes na infecção por *P. vivax* é a anemia, bem como trombocitopenia grave (contagem de plaquetas inferior a 50.000/ μ L), e mais raramente ruptura esplênica, malária cerebral e edema pulmonar (Guimarães de Lacerda, 2007). A trombocitopenia é descrita como usual em pacientes com malária por *P. falciparum*, sendo também considerado um evento hematológico comum em infecções por *P. vivax*, sem que haja relação deste achado laboratorial com sangramentos e manifestações hemorrágicas. Normalmente após o início do tratamento específico a contagem de plaquetas sobe rapidamente sem que haja necessidade de transfusão de plaquetas (Antinori et al, 2005).

Cabe salientar que a descrição de um caso grave de malária por *P. vivax* exige como condição primordial, a confirmação da espécie envolvida utilizando uma abordagem diagnóstica altamente sensível, por exemplo, PCR, para exclusão de uma infecção mista (*P. falciparum* / *P. vivax*), além de se excluir a presença simultânea de outras doenças infecciosas agudas (por exemplo, dengue), e também outras doenças crônicas que podem simplesmente descompensar na infecção pelo *P. vivax*, tal como a anemia falciforme (Daniel-Ribeiro et al, 2008).

A malária autóctone de Mata Atlântica é descrita como de curso benigno geralmente atípico, baixa parasitemia e sintomatologia muito leve (Branquinho et al 1997, Marques et al 2008. Em contraponto, Cerutti et al (2007) descrevem os sintomas da malária autóctone no estado do Espírito Santo como abundantes e de longa duração mas sem gravidade.

O principal elemento para o diagnóstico da malária, tanto nas áreas endêmicas como não endêmicas, é sempre evocar a doença. Como sua distribuição geográfica não

é homogênea torna-se importante durante a anamnese resgatar informações sobre a área de residência ou relato de viagens ou exposição à área de mata. O coeficiente de letalidade fora da área endêmica é muito superior à área endêmica (Brasil, MS 2013) em decorrência da falta de suspeição clínica da doença nas regiões não endêmicas, o que resulta em retardo diagnóstico e evolução para óbito (Oliveira-Ferreira et al, 2010).

O diagnóstico de certeza da infecção malárica só é possível através da demonstração do parasito por microscopia ou de moléculas parasitárias no sangue do paciente. A identificação precisa da espécie de *Plasmodium* infectante é fundamental para o tratamento adequado da pessoa doente. A técnica padrão para o diagnóstico no Brasil é a gota espessa (Brasil MS, 2005); esse procedimento requer uma considerável habilidade técnica na leitura das lâminas para um diagnóstico correto, especialmente nos casos de baixa parasitemia (Speers et al, 2003). Já a distensão sanguínea permite a diferenciação específica dos parasitos a partir da análise de sua morfologia e das alterações provocadas no eritrócito infectado (Brasil MS, 2005). Devido às limitações da microscopia, nos últimos anos tem-se utilizado o diagnóstico molecular, PCR - *polymerase chain reaction* ou reação da polimerase em cadeia (Hänscheid, 1999). A PCR tem se mostrado eficiente nos casos em que a parasitemia encontra-se abaixo do nível de detecção microscópica (Zalis et al 1996, Torres et al 2006), sendo uma ferramenta extremamente sensível para o diagnóstico de amostras pauciparasitadas, além de ser útil para genotipagem dos plasmódios e detecção de resistência aos antimaláricos.

A pesquisa de anticorpos para malária sejam eles de fase esporozoíta ou antígenos de formas eritrocitárias são úteis apenas para indicar o contato com o parasito, e não são rotineiramente utilizados como método diagnóstico. É uma técnica empregada em inquéritos epidemiológicos com objetivo de determinar a ocorrência de transmissão (Cerutti 2007).

JUSTIFICATIVA

Embora a transmissão da malária tenha sido considerada interrompida no estado do Rio de Janeiro no final da década de 1960, a identificação de casos esparsos nunca deixou de ocorrer e tem aumentado nos últimos anos, com cerca de 100 casos confirmados/ano (variando de 84 a 133 casos no período de 2005 a 2013) em sua grande maioria, correspondendo a casos importados adquiridos em regiões endêmicas. Esse aumento do número de casos se reflete no número de atendimentos a indivíduos com suspeita de malária no serviço de sentinela dos viajantes do IPEC/Fiocruz, que vem atendendo uma proporção crescente (cerca de 30%) dos casos de malária diagnosticados no estado do Rio de Janeiro, em sua maioria, indivíduos encaminhados de outras unidades de saúde. A associação de critérios clínicos e epidemiológicos é primordial para a suspeição da doença, isto é, a presença de sintomatologia geral, sobretudo com febre, em paciente procedente de área com transmissão indica obrigatoriamente, a solicitação do exame laboratorial para confirmação de malária. Nas áreas sem transmissão, o diagnóstico de malária é frequentemente dificultado pelo desconhecimento da doença por parte dos profissionais de saúde e pela inespecificidade de suas manifestações clínicas, comuns a outras doenças mais frequentes nesses locais, como o dengue no Rio de Janeiro.

Apesar dos casos autóctones representarem apenas uma pequena fatia dos casos de malária diagnosticados na região extra amazônica (10,1%), considerada área não endêmica e sem transmissão, a transmissão está localizada principalmente em áreas cobertas por mata Atlântica, e com presença de vetores do sub gênero *Kerteszia* e de bromélias; sua ocorrência mesmo que baixa é constante e apresenta um desafio às autoridades de saúde, uma vez que casos índices podem gerar casos secundários e até mesmo a possibilidade de reintrodução em regiões receptivas. Ademais, a ocorrência de casos de malária e a presença de infecções assintomáticas não diagnosticadas, podem ser responsáveis pela manutenção da transmissão do parasito, inclusive por hemotransfusões; já que em áreas não endêmicas, candidatos à doação de sangue são submetidos apenas a uma entrevista, antes de doar sangue.

No estado do Rio de Janeiro após eliminação da transmissão, um dos primeiros relatos da ocorrência de casos de malária autóctone ocorreu em 1993, através da

comunicação pessoal dos doutores Ricardo Lourenço de Oliveira e Marise Mattos responsáveis pela investigação de um aglomerado de casos de malária no município de Nova Friburgo, no distrito de Lumiar. Além da identificação dos casos, um inquérito soro epidemiológico realizado na área apontou para alta frequência de anticorpos (IgG - anti *P. vivax* pela Imunofluorescência Indireta) na população estudada. Desde então, são escassos os dados sobre malária autóctone no estado do Rio de Janeiro. Casos esporádicos com transmissão autóctone estavam concentrados e restritos em Lumiar até 2006, quando nosso grupo identificou casos em áreas na Mata Atlântica sem descrição prévia de transmissão e com pouca densidade populacional.

Se por um lado, o reduzido número de notificações de malária autóctone em nosso estado não nos permite ter uma dimensão real do que acontece nessa região, por outro, estudos realizados em estados vizinhos (SP e ES), também cobertos por Mata Atlântica confirmam, por métodos sorológicos ou moleculares, a presença de casos de malária e de infecção assintomática por *Plasmodium* em um número significativamente superior ao do estado do Rio de Janeiro, apesar de condições epidemiológicas e climáticas semelhantes.

Até o momento existem poucos dados referentes aos mecanismos de transmissão e das formas de apresentação clínica da malária adquirida na região de Mata Atlântica, que parecem ser diferentes da região Amazônica. A baixa parasitemia apresentada pelos casos sugere a possibilidade de um parasita mal adaptado ao homem. Evidências de infecção por *Plasmodium* em macacos relatados em áreas da Mata Atlântica onde ocorrem casos autóctones favorecem a hipótese de que a malária nessa região possa ocorrer em contexto de zoonose, e não como uma antroponose, como descrita em áreas endêmicas. Baseados nesses antecedentes, e com o objetivo de identificar as áreas em que a transmissão autóctone ocorre, avaliamos a epidemiologia da malária adquirida na região de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, a partir da investigação de casos autóctones atendidos no IPEC no período de 2006 a 2013.

OBJETIVO GERAL

Descrever os aspectos clínicos, epidemiológicos, sorológicos e moleculares da malária adquirida na região de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro a partir os casos diagnosticados no IPEC no período de 2006 a 2013.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever as características sócio-demográficas, geográfico-ambientais e clínicas dos casos de malária adquiridos na Mata Atlântica do Rio de Janeiro, atendidos no IPEC, no período de janeiro de 2006 a outubro de 2013.
2. Caracterizar morfológicamente e molecularmente as espécies de *Plasmodium* spp encontradas nos casos de malária adquiridos na Mata Atlântica.
3. Avaliar a resposta imune humoral dos casos de malária adquirida na Mata Atlântica aos antígenos de MSP1-19 de *P.vivax* e anticorpos IgG contra epítomos repetidos da proteína circunsporozoita (CSP) de *P. falciparum* e *P.malariae* e contra as variantes de CSP de *P.vivax*.
4. Estimar a prevalência de infecção por *Plasmodium* na vizinhança dos casos adquiridos na Mata Atlântica através de inquérito laboratorial (sorológico (MSP1-19 de *P.vivax*) e molecular).
5. Identificar e caracterizar os vetores capturados, nas regiões onde ocorreram os casos e investigar a possibilidade de infecção por *Plasmodium* através de exame molecular.
6. Investigar e caracterizar molecularmente a infecção por *Plasmodium* em um grupo de símios de um Centro de Primatologia localizado na Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro.

MÉTODOS

Estudo descritivo com quatro componentes:

1. Caracterização clínico-epidemiológica, parasitológica, sorológica e molecular dos casos de malária de Mata Atlântica diagnosticados e acompanhados no IPEC; e análise da distribuição espacial dos casos.
2. Inquérito (molecular e sorológico) domiciliar a partir dos casos índice.
3. Inquérito entomológico e caracterização de vetores nas regiões com casos.
4. Investigação de plasmódio em primatas da Mata Atlântica

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DOS CASOS DE MALÁRIA DE MATA ATLÂNTICA

Desenho de estudo

Estudo descritivo do tipo série de casos dos casos de malária autóctone atendidos pelo ambulatório de Doença Febril Aguda (DFA) do IPEC, no período de janeiro de 2006 a outubro de 2013.

Local de atendimento

Em 2004 foi criado no IPEC, o ambulatório de DFA, que se estabeleceu como pólo de referência para malária da região extra-amazônica e para o atendimento, diagnóstico e tratamento de febre nos viajantes, ele integra o CPD-Mal, centro de referência para a malária na região extra Amazônia.

A equipe multidisciplinar do ambulatório atende todos os dias pacientes febris, maiores de 12 anos, com os mais diversos quadros clínicos, referenciados de unidades básicas de saúde, hospitais secundários e terciários, encaminhados por secretarias de vigilância epidemiológica de municípios vizinhos, de embaixadas e consulados, ou aqueles que vêm por demanda espontânea. O atendimento é

oferecido diariamente e com atendimento médio de 25 a 40 pacientes por semana (Bressan 2010).

Seleção e Caracterização dos Casos

Critérios de elegibilidade

Critérios de Inclusão: casos de malária autóctone atendidos no Ambulatório de DFA do IPEC no período de janeiro de 2006 a outubro de 2013, com idade acima de 12 anos e história de moradia ou visita à Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro.

Critérios de Exclusão: indivíduos com história de deslocamento para áreas endêmicas de malária; uso compartilhado de seringas; hemotransfusões ou transplantes de órgãos e tecidos ou que residiam em áreas próximas a aeroportos.

Coleta de Dados Clínicos e Epidemiológicos e Acompanhamento dos Casos

Todos os indivíduos com malária autóctone foram avaliados por médicos infectologistas por meio de anamnese dirigida (entrevista para coleta de dados demográficos, história de exposição, sintomas e sinais clínicos) e exame físico completo.

O protocolo de consultas de acompanhamento dos pacientes com malária atendidos no serviço de DFA do IPEC foi dividido da seguinte forma: a primeira consulta (dia zero), na ocasião da suspeição clínica e confirmação laboratorial da infecção e instituição da terapêutica de acordo com a espécie que causou a infecção, seguida de consultas diárias até a negatificação da parasitemia, instituídas para o acompanhamento laboratorial e da resposta terapêutica dos casos, e as consultas seguintes, nos dias 7, 14, 21, 28, 40 e 60 após o início do tratamento para avaliação de parâmetros clínicos e laboratoriais.

Instrumento de coleta e Base de dados

Para a coleta de dados foi utilizado um questionário semi-estruturado de referência do ambulatório de DFA (vide anexo 1), com alta confiabilidade interobservador para sinais e sintomas (Daumas et al 2013). Essas informações geraram uma base de dados do período de janeiro de 2006 a outubro de 2013.

As variáveis de interesse foram: sexo, idade, dia, ano e mês do diagnóstico, local provável de aquisição da malária, história de entrada em área de mata, presença de comorbidades, tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico, caracterização da febre, sintomas clínicos, parasitemia e espécie de plasmódio, internação hospitalar e óbito.

➤ Ensaios Laboratoriais

Diagnóstico

O diagnóstico de malária foi realizado por exame direto, teste rápido (Optimal^R), e pela amplificação de ácidos nucleicos a partir da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase - *Polymerase Chain Reaction* - PCR.

Exame direto

Os exames diretos utilizados para a detecção de plasmódio nesse estudo permitiram a confirmação da infecção e a identificação da espécie plasmodial - exames microscópicos do sangue - gota espessa (distendido espesso) e distensão sanguínea (esfregaço ou distendido delgado), realizados segundo as normas técnicas do Ministério da Saúde (Brasil MS, 2005).

A leitura e inspeção de todos os campos microscópicos da gota espessa para estimativa da quantidade de parasitos no sangue foi realizada por dois examinadores de forma cega e independente no Laboratório de Parasitologia do IPEC.

Os métodos citados possibilitaram quantificar a intensidade do parasitismo, mediante a determinação da parasitemia por volume (μL ou mm^3) de sangue (Brasil MS, 2005). Seguindo as instruções do MS a parasitemia pode ser registrada em

cruzes ou em quantidade de parasitos por mm^3 ou μL (Quadro 1). Os casos 03, 04, 05 e 14 tiveram sua parasitemia descrita em formato semiquantitativo, para os demais casos foi utilizada a metodologia quantitativa.

Assumiu-se que em caso de parasitemia semiquantitativa = (+/2) o valor médio da parasitemia foi = 250 parasitas/ mm^3 .

Quadro 1 - Avaliação semi-quantitativa da densidade parasitária de *Plasmodium* pela microscopia em gota espessa de sangue

Número de parasitos contados/campo	Parasitemia qualitativa	Parasitemia quantitativa (por mm^3)
40 a 60 por 100 campos	^{1/2} +	200-300
1 por campo	+	301-500
2-20 por campo	++	501-10.000
21-200 por campo	+++	10.001-100.000
200 ou mais por campo	++++	> 100.000

Adaptado de Brasil, 2005.

Quando o número de parasitos encontrados foi inferior a 40 em 100 campos examinados, utilizou-se o número total absoluto encontrado nos 100 campos.

Além do exame direto do sangue periférico foi realizado o teste rápido Optimal[®] seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (OptiMAL-IT Malária Test Kit[®], 2011. Disponível em http://www.tcsbiosciences.co.uk/downloads/OptiMAL-IT_Diagrams_2011.pdf).

Caracterização morfológica do parasito

A análise descritiva morfológica do parasito e das células sanguíneas pela microscopia óptica foi realizada com utilização de microscópio NIKON Eclipse E200® com oculares de 7X e 10X e imersão em objetiva de 100X. A descrição dos parasitos foi realizada pela equipe do Laboratório de Parasitologia do IPEC e confirmada por um *expert* com mais de 30 anos de experiência em microscopia e referência nacional do Núcleo de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (*UnB*), Sr Francisco das Chagas Luz. Essa leitura foi feita também em forma cega. Os resultados foram comparados posteriormente. Não foram utilizadas ferramentas de medição ou comparação estatística.

Exame molecular

O teste molecular (PCR) foi realizado após extração de DNA, em que se utilizou Kit *Wizard® Genomic purification* (Promega) (segundo normas do fabricante), a partir de uma alíquota de 300µl de sangue.

Para o estabelecimento do diagnóstico molecular - gênero *Plasmodium* - foi utilizada a metodologia de PCR em formato *single* (técnica descrita e padronizada no Laboratório de Pesquisa em Malária do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz (Gama 2006).

A reação de PCR para detecção de *P. falciparum* foi realizada com a metodologia em formato *nested* (Zalis et al, 1996) e para *P. vivax* utilizou-se metodologia em formato *single* (Torres et al, 2006).

Como controles internos, foram utilizados sequências de DNA de humanos.

A extração do DNA e a técnica do exame molecular foram realizadas pelo Laboratório de Pesquisa em Malária do Instituto Oswaldo Cruz (LabMal/IOC).

A sensibilidade desta detecção é de níveis de parasitemia entre 0,01 e 0,001%, adequado para o diagnóstico de infecções sintomáticas e subpatentes.

Caracterização molecular através da análise de fragmentos

Uma amostra da alíquota de DNA utilizada para o diagnóstico molecular dos casos foi enviada para o Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (CPqRR) para análise de fragmentos. Estas amostras foram submetidas ao ensaio de diagnóstico molecular e genotipagem do parasito para a caracterização das espécies circulantes nas áreas (*P. vivax/P. simium*, *P. malariae/P. brasilianum* e *P. falciparum*).

Foram testados 10 loci de microssatélites e os blocos 2 e 10 da proteína MSP1, já padronizados para *P. vivax* no Laboratório de Malária/CPqRR (Koepfli et al. 2009). As análises foram baseadas na eletroforese capilar em sequenciador automático dos fragmentos amplificados por PCR dos *loci* de microssatélites e regiões polimórficas da proteína MSP1 para a determinação exata dos tamanhos dos alelos (Rezende et al 2010).

Caracterização do receptor DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines)

Também em colaboração com o Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (CPqRR) foi realizada a caracterização do receptor *DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines)* das amostras dos pacientes incluídos no estudo, com exceção dos casos 1, 6 e 14 que não tinham amostras disponíveis para execução da técnica. O protocolo utilizado neste trabalho foi baseado no descrito por Sousa et al (2007), com modificações.

Tratamento

O tratamento de todos os casos foi instituído seguindo as recomendações instituídas pelo Ministério da Saúde no Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil (Brasil MS 2008b).

Aspectos sorológicos

Pesquisa de anticorpos IgG contra a proteína recombinante MSP-1₁₉ de P. vivax por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Uma amostra de soro no momento do diagnóstico e outra nos momentos de controle de cura de 11 casos de malária autóctone (em função da disponibilidade de amostras) foram submetidas ao teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando-se antígeno recombinante de MSP1₁₉ de *P. vivax* para pesquisa de anticorpos IgG.

As placas de ELISA (*Nunc/Maxisorp*) foram sensibilizadas por 12 h a 4°C com a adição de 50 µl da proteína recombinante (*Pv MSP-1₍₁₉₎*) em uma concentração de 4µg/ml em tampão Carbonato-bicarbonato (Na₂CO₃ 16mM *Sigma*, Na₂HCO₃ 34 mM *Sigma*) pH 9,6. Após a sensibilização, as placas foram lavadas por três vezes com PBS (NaCl 139 mM; KCl 2,68 mM; Na₂HPO₄ 8,10 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM - pH 7.2, *Sigma*) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T20). Posteriormente os poços foram saturados com 200µl de uma solução de PBS-T20 contendo 3% de leite desnatado (*Molico*) e incubadas durante 2 h a 37 °C. Decorrido o tempo de saturação, as placas foram novamente lavadas por três vezes com PBS-T20 e incubadas durante 1 h a 37 °C com os soros-teste diluídos a 1:100 em PBS-T20 + 1% de leite *Molico* (PBS-T20-*Molico*). Após três lavagens com PBS-T20, as placas foram incubadas com anti-IgG humana conjugada à peroxidase (*Sigma*) diluída a 1:2.000 em PBS-T20-*Molico*, durante 1 h a 37 °C, e novamente lavadas com PBS-T20. Finalmente, 100µl de uma solução de OPD (orto-fenil-etilenodiamino, *Sigma*) a 10mg/25ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 contendo 10µl de H₂O₂ 30% foram adicionados por poço e as placas incubadas por aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de H₂SO₄ 2N (50µl por poço) e a leitura das densidades óticas (DO) feita em espectrofotômetro *SpectraMax 190* (*Molecular Devices*) no comprimento de onda de 492nm.

Todas as amostras de soro foram testadas em duplicata e cada placa recebeu um controle "branco" (sem soro), um soro-padrão reativo e cinco soros-padrão não

Todas as amostras foram testadas em duplicata na diluição de 1:100 e em cada placa foram colocados soros-padrão reativos (controle positivo do experimento) e soros-padrão não reativos de indivíduos moradores de áreas não endêmicas de malária que nunca contraíram a doença (controle negativo do experimento). Em cada experimento foi calculada a média das densidade ótica (Dos) dos controles negativos e três desvios-padrões foram somados a esta média, obtendo-se assim o valor do ponto de corte (*cut-off*). As médias das DOs das duplicatas de cada soro foram divididas pelo *cut-off* do experimento e o valor desta razão foi chamado de *Índice de Reatividade* (IR). Soros com índice de reatividade maior que 1 foram considerados positivos, ou seja, apresentavam resposta positiva de anticorpos IgG contra o antígeno testado.

Amostras positivas para proteína circumsporozoita (CSP) de *P.falciparum* foram também testadas para as proteínas recombinantes representando a proteína de superfície de merozoita (MSP3) e a proteína rica em glutamato (GLURP) de *P. falciparum*. A proteína MSP3 esta presente na fase eritrocítica e a GLUP em todas as fases do ciclo evolutivo do *Plasmodium* no homem.

Os testes de Elisa foram realizados pelo Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, utilizando protocolos previamente descritos (Nardin et al 2000, Oliveira-Ferreira et al 2004, Arruda et al 2007).

Reação de Imunofluorescência Indireta – IFI - para detecção de anticorpos contra estágios eritrocitários de P.vivax

A técnica de imunofluorescência indireta (IFI) é considerada a técnica de referência na sorologia da malária.

I. Obtenção do antígeno de *P. vivax*:

Pela impossibilidade de se manter em laboratório uma cultura *in vitro* contínua de *P. vivax*, os esquizontes maduros que foram utilizados para a confecção das lâminas

de imunofluorescência indireta (IFI) foram obtidos diretamente de um indivíduo com malária, com parasitemia maior que $10.000/\text{mm}^3$ de sangue. Foram coletados desse paciente, 9 mL de sangue em tubo com heparina. A amostra foi centrifugada a 1500 rpm para retirada do plasma. Em seguida, as hemácias foram lavadas três vezes com PBS estéril por centrifugação a 1500 rpm, por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo o hematócrito ajustado para 10 % com PBS estéril.

Para o isolamento de esquizontes, foi utilizada a técnica de separação celular por colunas magnéticas (MACS, magnetic activated cell sorting). Brevemente, a suspensão hemácias foi transferida para colunas 25LD e então colocadas em campo magnético de um separador MACS (QuadroMACS®, Miltenyi Biotec, EUA). As hemácias normais e contendo formas imaturas do parasito passaram pela coluna na presença de campo magnético. Após a remoção da coluna do campo magnético, os esquizontes magneticamente retidos (seleção positiva) foram eluídos (PBS), lavados (PBS), suspensos v/v de PBS e quantificados por microscopia ótica.

A diluição ótima do antígeno foi calculada pela fórmula proposta por Ferreira e Sanches (1988): $VD = (2,5 \times N)^{-1}$, onde VD é o volume de PBS para diluição do sedimento de hemácias e N é o número médio de hemácias parasitadas com esquizontes por campo microscópico. Após a determinação do número de hemácias parasitadas por campo, a suspensão obtida foi imediatamente depositada sobre áreas demarcadas nas lâminas de vidro próprias para IFI ($5 \mu\text{l}/\text{área}$), formando uma fina camada de hemácias, obtendo-se cerca de 20 a 30 hemácias parasitadas por campo microscópico com a objetiva de 40x. Após secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram armazenadas, uma a uma com papel absorvente, e em grupos de 10 com papel alumínio, seladas com plástico, e conservadas a -70°C , até o momento do uso.

II. Desenvolvimento da técnica

As lâminas de IFI contendo com o antígeno foram retiradas do freezer e colocadas a 37°C para descongelar e secar. Após secagem, foram fixadas com acetona gelada por 5 minutos e lavadas com PBS poço por poço. Alíquotas de $10 \mu\text{l}$ dos soros diluídos em PBS (1/50 a 1/6400) foram adicionadas a cada poço da lâmina conforme esquema prévio. As lâminas foram então incubadas a 37°C por 40 minutos em câmara úmida. Após a incubação, foram lavadas por três vezes com PBS (5 minutos por lavagem, sob agitação) e colocadas a 37°C para secar. Uma anti-IgG humana conjugada à fluoresceína (Sigma) foi diluída a 1:200 em solução de Azul de Evans a 1% e

adicionada às lâminas na quantidade de 10 µl por poço. Após nova incubação em câmara úmida durante 40 minutos a 37° C, as lâminas foram submetidas à nova lavagem de 5 minutos com PBS por 3 vezes, sob agitação. Após secagem foram montadas com glicerina tamponada (0,5 M Na₂CO₃ e Na₂HCO₃) e lidas em microscópio de imunofluorescência, com objetiva de 40 X e ocular de 10X. Foram considerados positivos todos os soros com fluorescência igual ou maior àquela apresentada pelo controle positivo, a partir da diluição de 1:50. A gradação em cruces foi feita comparando-se os soros testados com os controles positivo e negativo. Determinou-se empiricamente valores em cruces para as leituras das lâminas com os plasmas-teste diluídos a partir de 1:50, assim como graus para as respectivas intensidades de luminescência das reações. Designou-se então valores em cruces conforme quadro 2:

Quadro 2 – Intensidade da reação de IFI em cruces

Valor	Intensidade da reação
+/	limiar de positividade
+	fraca
++	média
+++	forte
++++	muito forte

A técnica de imunofluorescência direta foi realizada Laboratório de Pesquisa em Malária do Instituto Oswaldo Cruz (LabMal/IOC).

Análise Espacial dos Casos e Confecção dos mapas

Para a análise das informações ambientais que podem ter relação com os casos de malária adquiridos na Mata Atlântica, foram coletadas em campo as coordenadas geográficas do local de exposição e do provável local de aquisição da infecção. Para isso foi utilizado o *Global Positioning System, GPS*. O aparelho utilizado para a marcação das coordenadas foi o eTrex Vista® fabricado pela empresa Garmim® .

Para a confecção dos mapas foi utilizado o programa Arcgis 10.0, com o elipsóide de referência WGS84 (World Geographic System) e o Sistema de Projeção

Universal Transversa de Mercator (UTM). Também foram utilizados dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), referentes aos limites geopolíticos dos municípios.

A análise espacial dos casos foi realizada em colaboração com o Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

INQUÉRITO

O estudo transversal foi realizado no período de janeiro de 2006 a outubro de 2013, na Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro, a partir da identificação de casos de malária autóctone atendidos no ambulatório de DFA do IPEC.

Local do estudo:

O estudo foi realizado nos municípios: Guapimirim, Macaé, Cachoeiras de Macacu, Sapucaia, Nova Friburgo e Teresópolis, áreas próximas ou cobertas por Mata Atlântica, onde ocorreram os casos de malária. A figura 5 ilustra a divisão geopolítica do estado.

Figura 5 - Mapa de divisão geopolítica do Estado do Rio de Janeiro

município de Cachoeiras de Macacu tem uma população total de 54.273 mil habitantes e um território de 953,801 km²; o município de Nova Friburgo tem uma população de 182.082 mil habitantes e um território de 933,414 km². O município de Sapucaia tem 17.504 habitantes e um território total de 540,350 km². No município de Teresópolis, se localiza a sede do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. A população total do município é de 167.622 habitantes e sua área total 770,601 km².

Mesmo fazendo parte da Serra dos Órgãos, como não foram identificados casos autóctones de malária nos municípios de Magé e Petrópolis, e sendo assim, as mesmas não são descritas neste trabalho.

Logística das visitas a campo

Todo caso suspeito de malária autóctone atendido no IPEC era investigado. Após a confirmação da autoctonia (através da história epidemiológica) era realizado contato telefônico com o paciente, informando sobre a visita da equipe de estudo à região provável aonde ocorreu a transmissão da malária.

Os locais prováveis de infecção dos casos 01, 02 e 03 não foram visitados devido à incapacidade de se limitar o local exato de exposição. Todos os contactantes dos casos 02 e 03 foram convidados a comparecer ao Ambulatório de DFA para coleta de dados epidemiológicos e material para os exames já citados. Estes indivíduos foram incluídos no estudo 14 dias após o diagnóstico do caso 2.

A visita ao local de infecção dos casos 04, 05, 06 foi realizada imediatamente após o diagnóstico do primeiro caso na região, contudo, a coleta de sangue da população exposta ocorreu 20 meses após o diagnóstico dos casos.

Do caso 07 ao caso 13 as primeiras visitas a campo foram realizadas de 22 a 70 dias após o diagnóstico dos casos.

O local provável de infecção do caso 14 não foi visitado porque a proprietária não autorizou a visita da área pela equipe.

O número de viagens a cada área foi realizada em função da cobertura dos habitantes da região.

Critérios de inclusão, exclusão, seleção e caracterização da população exposta

O indivíduo exposto incluído no estudo foi definido como maior de cinco anos de idade, morador ou visitante de um raio máximo de dois quilômetros determinados pela capacidade de deslocamento do vetor (Ferreira E et al, 1969), a partir da possível exposição do primeiro caso no local. A seleção dos expostos foi realizada através da busca ativa em cada área estudada.

Os critérios de exclusão foram: indivíduos com história de deslocamento para áreas endêmicas de malária nos três meses anteriores a coleta de dados e material biológico; ou uso compartilhado de seringas; ou hemotransfusões ou transplantes de órgãos e tecidos;

A participação voluntária dos indivíduos foi efetivada por meio do TCLE (anexo 2).

População estudada

Censo dos habitantes e viajantes provenientes das áreas, geograficamente e cronologicamente associadas à ocorrência dos casos.

Coleta de dados

Para a coleta de dados da população exposta foi utilizado um questionário específico contendo variáveis demográficas, epidemiológico-clínicas (anexo 3).

Seguimento

Em indivíduos sintomáticos foi realizado exame físico geral com coleta sistemática da temperatura axilar, esplenometria e hepatometria, seguido de encaminhamento do paciente ao ambulatório de DFA, para a pesquisa de malária. O indivíduo com diagnóstico positivo passava a ser caso e o negativo se mantinha no grupo para monitoramento de malária durante o período do estudo, através da vigilância de síndrome febril.

Coleta e Processamento de Amostras

Realizou-se a coleta local de sangue de cada indivíduo em duas amostras. Uma amostra de cinco mililitros (ml) de sangue total em tubos vacutainer® contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para diagnóstico e caracterização molecular através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); e outra amostra de 8 ml de sangue coletada em tubo vacutainer® sem anticoagulante para realização de sorologia. Essas amostras foram centrifugadas ainda no campo para obtenção do soro e conservadas a 4°C, em recipiente com gelo seco. O material era posteriormente transportado para a Fiocruz e armazenado a -20°C.

Toda coleta foi realizada com utilização de material descartável, obedecendo às normas de precaução padrão e biossegurança.

Pesquisa de plasmódio

A pesquisa de plasmódio na população exposta foi realizada através de teste molecular (PCR), com a mesma metodologia descrita na pág 35.

Inquérito Sorológico

As amostras de soro da população exposta foram submetidas a pesquisa de anticorpos IgG contra a proteína recombinante MSP-1₁₉ de *P. vivax* através da técnica ELISA seguindo a mesma metodologia mencionada na página 19.

As sorologias foram realizadas pelo Laboratório de Malária do Instituto Oswaldo Cruz (LabMal/IOC).

Considerações éticas

Todos os sujeitos elegíveis eram incluídos no estudo somente após assinatura do TCLE. O projeto “*Investigação dos casos de malária autóctone na Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro*” foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do IPEC sob o número de processo 0062.0.009.000-11.

CARACTERIZAÇÃO DE VETORES

Captura de adultos

Em estudo paralelo, realizado pela equipe do Laboratório de Transmissores de Hematozoários (LATHEMA) do IOC, foram coletados adultos e larvas de anofelinos, na região próxima às localidades em que se deslocavam os casos já notificados, a saber: Guapimirim (bairro Monte Olivette), Macaé (Sana), Cachoeiras de Macacu (Santana de Japuíba), Nova Friburgo (Macaé de Cima), com o objetivo de correlacionar a presença de vetores com os casos de malária da região. Essas coletas foram esporádicas e ocorreram no mesmo dia em que foi realizada a coleta de dados e exames da população humana.

Para investigar a fauna de anofelinos da região do Sana, município de Macaé, foram estabelecidas duas áreas para coletas de adultos e formas imaturas desses culicídeos, identificadas como *ponto 1* local provável de infecção de um caso de malária (caso 7) e *ponto 2*, local de permanência do caso 7, área que recebe muitos visitantes e onde a equipe de entomologia que realizou as capturas ficou hospedada. A investigação entomológica nesses lugares se estendeu por um período de 18 meses, de novembro de 2011 a abril de 2013.

As coletas de adultos foram realizadas quinzenalmente, por duas noites consecutivas. Os mosquitos capturados eram colocados em gaiolas próprias, trocadas em intervalo de uma hora, durante as coletas. Dados sobre a temperatura e umidade também foram obtidos, a cada intervalo. Os mosquitos eram levados vivos, seguindo as normas de biossegurança da legislação vigente, para o insetário do LATHEMA, onde eram triados, identificados, e criopreservados para pesquisa de infecção por plasmódios.

Em Guapimirim as coletas de adultos ocorreram no período de janeiro a junho de 2012. Foram realizadas uma ou duas coletas a cada mês, utilizando-se apenas armadilha Shannon e luz entre 17:00 e 22:00h, com a mesma metodologia usada para as coletas na região do Sana.

Nas localidades de Japuíba e Macaé de Cima, as coletas foram realizadas de forma esporádica nos períodos de agosto a setembro de 2011 e em julho de 2012 seguindo a mesma metodologia descrita acima.

Em todos os locais as coletas de adultos foram realizadas no período compreendido entre as 17:00 e 22:00h, utilizando-se armadilha Shannon. Na maioria das coletas utilizou-se isca animal (cavalo).

Coleta de larvas

Em todas as localidades, durante o dia, nas imediações dos locais estipulados para as coletas dos mosquitos adultos, foram realizadas buscas exploratórias por criadouros como bromélias, depressão no solo, lagos, margens de riachos e valas, onde se esperava obter formas imaturas de anofelinos. As pesquisas nesses criadouros foram realizadas ao longo dos meses que duraram as coletas de adultos, utilizando-se concha entomológica para coletas em coleções líquidas no solo, ou sugadores manuais para coletas em bromélias. As larvas eram transportadas em sacos próprios com essa finalidade, para o insetário do LATHEMA, onde eram criadas até a fase adulta, e, posteriormente identificadas.

Identificação das espécies

A identificação das espécies, tanto dos adultos quanto das formas imaturas, foi realizada pela observação dos caracteres morfológicos, utilizando-se chaves dicotômicas para culicídeos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994, Forattini 2002) no LATHEMA/IOC.

Pesquisa de plasmódio nos vetores

Os mosquitos foram dissecados e posteriormente tiveram sua cabeça e tórax triturados individualmente em tubos do tipo “*eppendorf*” (identificados com o código de cada mosquito) em 50 µl de água destilada estéril. Foram adicionados 200 µl de DNAzol e após serem bem macerados, foram centrifugados por 10 minutos a 15.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e transferido para novo tubo *eppendorf*, acrescentado 125 µl de etanol absoluto (100%) e mixado. Os tubos foram novamente centrifugados por 15 minutos a 15.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuscitado em 200 µl de etanol 70% e centrifugado por 15 min a 15.000 rpm. O sobrenadante foi

novamente descartado e o pellet deixado para secar a 55 °C por 10 minutos. Foi acrescentado 40 µl de água DNA free e misturado bem. Os tubos foram mantidos overnight em temperatura de 4 °C. Extração de DNA dos mosquitos foi realizada pelo Laboratório de Pesquisa em Malária do IOC.

ESTUDO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS

O estudo em primatas não humanos foi realizado em parceria com o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), órgão criado em 1975, gerido pelo Instituto Estadual do Ambiente (INEA), e localizado a cerca de 100 quilômetros do centro da cidade do Rio de Janeiro no município de Guapimirim, na Serra dos Órgãos, entre os municípios de Magé e Cachoeiras de Macacu. Atualmente o CPRJ mantém em cativeiro 250 primatas de pequeno e médio porte, distribuídos em 85 viveiros, ocupando área aproximada de 264.920 hectares vizinho de mata com riqueza biótica significativa.

Foram examinados 30 primatas não humanos; a coleta das amostras foi realizada em novembro de 2011, pelo Dr. Alcides Pissinati, médico veterinário, pesquisador e diretor do CPRJ. Foram retirados aproximadamente 2 ml de sangue total de cada animal. O volume foi calculado com base na volemia e peso do animal. Para apenas alguns indivíduos foi necessário sedação com Quetamina® e Midazolan. As amostras foram alíquotadas em volumes iguais. Todo o material foi enviado para Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (CPqRR). Uma alíquota foi designada para procedimentos sorológicos e a outra para exame molecular.

Outros seis primatas apreendidos pelo IBAMA e mantidos no Criadouro Passaredo, em Guaratiba, bairro da cidade do Rio de Janeiro, incluídos no programa de soltura do IBAMA tiveram suas amostras coletadas em novembro de 2013. Foram retirados aproximadamente dois ml de sangue total, calculados com base na volemia e peso do animal. Para todos esses indivíduos foi necessário sedação com Quetamina® e Midazolan. Todos os procedimentos foram realizados pelo médico veterinário do Criadouro e pelo Dr. Alcides Pissinati. As amostras foram alíquotadas em volumes iguais. Uma alíquota foi designada para procedimentos sorológicos, realizados no LabMal/IOC e a outra para exame molecular, enviado para o Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (CPqRR).

A investigação do óbito de outros dois primatas também foi realizada, pela análise de fragmentos de baço e fígado. Estes fragmentos foram conservados a seco e em solução salina a -70°C na Fiocruz e posteriormente enviados para Laboratório de Malária do CPqRR para extração de DNA e pesquisa de plasmódio. A extração de

DNA foi realizada utilizando o kit QIAGEN (PUREGENE®, Genra Systems, Minneapolis, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Amostras de DNA foram amplificadas através da Nested-PCR baseando-se na metodologia descrita por Snounou et al, 1993, com modificações, conforme descrita abaixo.

Inquérito molecular nos primatas não humanos

Extração de DNA à partir de sangue total

A extração do DNA genômico dos indivíduos foi realizada utilizando-se o kit QIAGEN (PUREGENE®, Genra Systems, Minneapolis, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Para cada 1 mL de sangue total foram acrescentados 3 mL de solução de lise para eritrócitos em um tubo Falcon (15 mL). Após lise visível (\pm 10 minutos), a mistura foi centrifugada a 2000 x g, por 10 minutos, a 25°C. O sobrenadante foi então removido e o material ressuspenso em 1 mL de solução de lise celular. Em seguida, foram adicionados 300 μ L de solução de precipitação de proteína, sendo o material submetido por 30s em agitador de tubos (vórtex), e centrifugado a 2000 x g, por 10 minutos, a 25°C. O sobrenadante contendo o DNA solúvel foi precipitado em um tubo contendo 1 mL de isopropanol P.A. (Merck) à 4°C. Em seguida, o DNA foi centrifugado a 2000 x g, por 3 minutos, a 25°C, sendo o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1 mL de etanol 70% para a lavagem do DNA seguido de centrifugação a 2000 x g, por 1 minuto, a 25°C. O sobrenadante foi novamente descartado e após a completa evaporação do etanol por aproximadamente 15min, o DNA foi hidratado com solução de hidratação (Tris-hidrometil aminometano, EDTA) e incubado por 1 hora, a 65°C. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o seu uso. As concentrações das soluções utilizadas em cada um dos kits não são disponibilizadas pelo fabricante.

Extração à partir de fragmentos de órgãos

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit QIAGEN (PUREGENE®, Genra Systems, Minneapolis, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Primeiro o órgão foi macerado. Para cada 25 mg de amostra foram acrescentados 80

μL de PBS e 100 μL de solução de lise ATL, em um tubo *ependorf* (1,5 mL). Após esse passo, foi adicionado 20 μL de Proteinase K. A mistura foi vortexada, e incubada por 3 horas a 56°C, e centrifugado brevemente. Em seguida foi adicionado 200 μL de Tampão AL, *vortexado* e incubado por 10 minutos a 70°C. Foi adicionado no tubo 200 μL de etanol (Merck), levado ao *vortex* e centrifugado brevemente. Em seguida, a amostra foi colocada em uma coluna, centrifugada a 8000 rpm, por 1 minuto, a 25°C, sendo o sobrenadante descartado. Foi adicionado 500 μL de AW1, centrifugada a 8000 rpm, por 1 minuto, a 25°C, sendo o filtrado descartado. Em seguida foi adicionado 500 μL de AW2, centrifugada a 14000 rpm, por 3 minutos, a 25°C, sendo o sobrenadante descartado, e posteriormente centrifugada a 14000 rpm, por mais 1 minuto, a 25°C, e o sobrenadante novamente descartado. A coluna foi colocada em um novo tubo e o DNA foi hidratado com 200 μL de solução de hidratação (AE) e incubado por 3 minutos e centrifugado a 8000 rpm, por 1 minuto. Esse passo foi repetido mais uma vez, após 3 minutos. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o seu uso. As concentrações das soluções utilizadas em cada um dos kits não são disponibilizadas pelo fabricante.

Controle das extrações de DNA genômico

A fim de averiguar se as extrações de DNA foram realizadas com sucesso, as amostras de DNA foram submetidas a uma PCR para amplificar o gene citocromo B de mamíferos.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Nested-PCR

Amostras de DNA foram amplificadas através da Nested-PCR baseando-se na metodologia descrita por Snounou et al (1993), com modificações. Este protocolo amplifica regiões de gênero e espécie específicas dentro da subunidade menor do RNA ribossomal, gene 18S. A Nested-PCR amplifica na primeira reação um fragmento de 1200 pb (sequência gênero-específica) e na segunda reação sequências espécie-específicas são amplificadas. As reações foram realizadas em volumes de

20µL utilizando-se: 80 ng de amostra de DNA, 250nM de cada um dos iniciadores, 10µL de Master Mix (PROMEGA-0,3U Taq DNA Polimerase, 200µM de cada um dos dNTPs e 1,5mM MgCl₂). As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-100™ Version7.0 - MJ Research e as condições da PCR foram, para a primeira reação: um ciclo de 95°C por cinco minutos, 58°C por dois minutos, 72°C por dois minutos, 24 ciclos de 94°C por um minuto, 58°C por dois minutos, 72°C por cinco minutos, 4°C por tempo ilimitado. A segunda reação foi realizada nas mesmas condições, porém com 29 ciclos.

PCR em Tempo Real

O protocolo de PCR em Tempo Real utilizado neste trabalho foi baseado no descrito por (Mangold et al 2005), com modificações. O protocolo descrito por estes autores se baseia na detecção das quatro espécies de plasmódios humanos, na utilização de apenas um par de iniciadores consenso, desenhado em uma região espécie-específica da subunidade menor do RNA ribossomal, gene 18 S. Tais iniciadores amplificam fragmentos que variam no número de nucleotídeos e esses diferentes tamanhos são analisados e discriminados por meio de curvas de dissociação, que permitem a diferenciação das espécies de plasmódios. As reações foram realizadas em volumes de 20µL, utilizando 200ng de amostra de DNA, 0.5 mM de cada iniciador, 2.5mM de MgSO₄ e 10µL de SYBR Green PCR *master mix* (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As amplificações e a detecção da fluorescência foram conduzidas no ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As condições da PCR foram um ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos em 90°C por 20 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 30 segundos.

Visualização dos fragmentos por gel de agarose

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em eletroforese em gel contendo 2% de agarose (Invitrogen) dissolvida em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), sendo adicionados 5µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen).

As amostras de DNA foram misturadas em tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol, 40% sacarose) e aplicadas em cada uma das canaletas do gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada em um sistema horizontal (Bio-Rad) a 100V, por cerca de 30 minutos. O gel foi analisado em transluminador ultravioleta (UVP - Bio-Doc it System) e arquivado em sistema digital.

Em todos os ensaios de PCR foram utilizados controles positivos e negativos nas reações. Como controles negativos foram utilizados amostras de DNA de primatas não-humanos negativos para malária. Como controles positivos foram utilizados: (i) *P. falciparum*, DNA proveniente de cepa de cultivo contínuo mantido no Laboratório de Malária (CPqRR); (ii) para *P. vivax/P. simium*, DNA de símio com infecção aguda e parasitemia confirmada pela microscopia óptica; (iii) para *P. malariae/P. brasilianum*: DNA de Referência do MR4 (Banco Internacional de Reagentes de Referência de Malária – ATCC, USA). Os iniciadores utilizados neste estudo estão demonstrados no quadro 3.

Quadro 3 - Iniciadores utilizados no estudo.

PCR	Alvo	Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
Nested 1ª Reação	<i>gene 18S de Plasmodium sp.</i>	rPLU5	5'CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC 3'	1200 pb	Snounou et al. 1993
		rPLU6	5' TAAAAATTGTTGCAGTTAAAACG		
Nested 2ª Reação	<i>gene 18S de P. vivax</i>	rVIV1	5'CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATA C3'	120 pb	Snounou et al. 1993
		rVIV2	5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATAT T3'		
	<i>gene 18S de P. falciparum</i>	rFAL1	5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATAT T3'	205 pb	
		rFAL2	5'ACACAATGAACTTCAATCATGACTACCCG TC3'		
<i>gene 18S de P. malariae</i>	rMAL1	5'ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATACCCG 3'	144 pb		
	rMAL2	5'AAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA 3'			

PCR em Tempo Real	<i>gene 18S de Plasmodium sp</i>	P1	5' TAA CGA ACG AGA TCT TAA 3'		Mangold <i>et al.</i> 2005
		P2	5' GTT CCT CTA AGA AGC TTT 3'		
		MSP1b12 R	5' CTCCTTCAGCACTTTCACGCGCTT 3'		
PCR Convencional	Citocromo B de mamíferos	cyBF	5' CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3'	350 pb	Quaresma <i>et al.</i> 2012
		cytBR	5' CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3'		

Sequenciamento das amostras de símios positivas

As amostras positivas foram purificadas por meio do kit de purificação Qiagen (PUREGENE®, Genra Systems, Minneapolis, USA). Em seguida, foram enviados 20µl de produto a 50ng/ µl para a empresa de sequenciamento Macrogen®. Os produtos foram dosados em Nanodrop e também em gel de agarose de todos os alvos moleculares descritos neste estudo.

Inquérito sorológico nos primatas não humanos

Pesquisa de anticorpos IgG contra a proteína recombinante MSP-1₁₉ de P. vivax por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Os soros dos animais foram diluídos a 1:100 em PBS-T20-Molico e, frente à indisponibilidade de conjugado específico anti-imunoglobulina de cada espécie de primata testada, o ensaio foi realizado com uma imunoglobulina de coelho anti-IgG de *Saimiri* produzida no Laboratório de Pesquisa em Malária do IOC, diluída a 1:8.000 em PBS-T20-Molico. Em seguida, uma anti-IgG de coelho conjugada a peroxidase (Sigma) diluída a 1:5000 em PBS-T20-Molico foi adicionada. Após 1h de incubação, as placas foram lavadas, continuando as etapas como descrito acima. O resultado foi interpretado seguindo o mesmo critério adotado para as amostras séricas humanas.

Considerações éticas

Como não havia manipulação direta pelo grupo de pesquisa dos animais, a coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA da Fiocruz, dispensou a submissão do Projeto ao CEUA e manifestou-se favorável ao processamento e análise, pela Fiocruz, das amostras de sangue de macaco coletadas pelo diretor e veterinário do Centro de Primatologia.

ANÁLISE DE DADOS

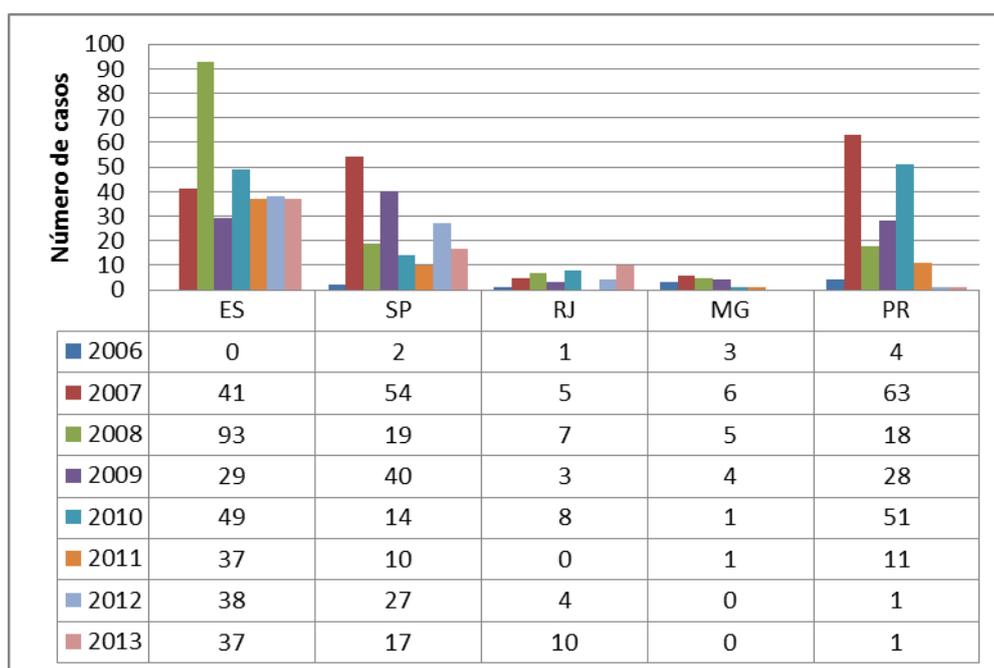
Foi construída uma base de dados no programa *Microsoft Excel* (2010). A análise estatística foi efetuada usando o programa *EpiInfo 3.5.3* (CDC Atlanta, 2011) ou o programa *Graphpad Prisma Software®*. As variáveis categóricas foram analisadas usando os testes de Qui quadrado (X^2) com correção de Yates para proporções e em caso de valores esperados menores que cinco foi feito o teste de Fisher. Para as variáveis contínuas foram realizadas análises de distribuição de frequências, medidas de tendência central (médias e medianas), medidas de dispersão (variância e desvio padrão e quartis). Para correlação de duas variáveis numéricas foi utilizado teste não paramétrico - teste de Spearman. Em todos os casos foi considerado como estatisticamente significativo um valor de p menor de 0,05.

RESULTADOS

De acordo com os dados do Programa Nacional Controle da Malária (PNCM), no período de janeiro de 2006 até dezembro de 2013 foram notificados 8410 casos de malária na região extra Amazônica, dos quais 1068 classificados como autóctones.

Os estados da região Sudeste (Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais) registraram, no período citado, 565 casos autóctones, o que representa 52,9% dos casos autóctones registrados no país no período. Ao se incluir o estado do Paraná (região Sul do país), 69,6% dos casos autóctones do país se concentram nestes estados. O gráfico a seguir ilustra o número de casos/ ano nestes estados.

Gráfico 1 – Casos autóctones registrados na região Sudeste e no estado do Paraná no período de 2006 a 2013.



Fonte: Dados fornecidos pelo Programa Nacional Controle da Malária (PNCM), Ministério da Saúde.

Em relação aos dados notificados pela Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro (SES-RJ), 38 casos de malária foram identificados como autóctones no período deste estudo. Os municípios com casos autóctones são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Número de casos, local e ano de notificação da malária autóctone no estado do Rio de Janeiro.

LOCAL	ANO	Nº
Rio de Janeiro	2006 (1) 2007 (1) 2009 (3)	5
Guapimirim*	2007 (1) 2008 (1) 2010 (1)	3
Nova Friburgo*	2007 (3) 2008 (4) 2010 (3) 2012 (1) 2013 (3)	14
Casimiro de Abreu	2008	1
Parati	2008	1
Cachoeiras de Macacu*	2010	1
Conceição de Macabu	2010	1
Macaé*	2010 (2) 2013 (2)	4
Magé	2012	1
Resende	2012* (1) 2013 (1)	2
Santa Maria Madalena	2012	1
Duque de Caxias	2013	2
São José do Vale do Rio Preto	2013	1
Teresópolis*	2013	1
TOTAL	Dados de janeiro de 2006 a Outubro de 2013.	38

*municípios com casos apresentados neste estudo.

Fonte: Dados gentilmente cedidos pelo Programa Nacional Controle da Malária (PNCM), Ministério da Saúde.

Neste mesmo período foram confirmados 177 casos de malária no Ambulatório de Doenças Febris Agudas (DFA/IPEC), dos quais 14 (8%) com evidências de transmissão autóctone.

Do total de casos autóctones diagnosticados no estado no período (n=38), 37% (n=14) foram atendidos no DFA/IPEC. A tabela 2 apresenta o número de casos autóctones identificados/ ano tanto no estado do RJ quanto no DFA/IPEC.

Tabela 2 – Número de casos autóctones de malária notificados no estado do Rio de Janeiro e número de casos identificados no Ambulatório de Doenças Febris Agudas (DFA/IPEC).

<i>Ano</i>	<i>Casos notificados pelo Estado</i>	<i>Casos identificados no IPEC</i>	<i>Frequência de casos atendidos no IPEC (%)</i>
2006	01	01	100%
2007	05	00	00
2008	07	02	28.5%
2009	03	01	33.3%
2010	08	02	25%
2011	00	02	-
2012	04	01	25%
2013	10	05	50%
Total	38	14	37%

Identificação dos casos atendidos no IPEC - Localização, Características geográficas e ambientais

Para facilitar a identificação clínica e epidemiológica dos indivíduos garantindo ao mesmo tempo o sigilo das informações dos pacientes, os casos classificados como autóctones foram identificados em ordem numérica.

A suspeição clínica e o diagnóstico dos casos 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 foram realizados no IPEC, enquanto os demais casos (3, 4, 5, 6 e 14) foram diagnosticados em outras unidades e acompanhados no IPEC.

No ano de 2013 foram diagnosticados cinco casos (36%). Em 2011, 2010 e 2008 dois casos/ano (14%), 2012, 2009 e 2006 um caso/ano (7%). No ano de 2007 não houve identificação de casos autóctones.

A malária ocorreu predominantemente nos meses mais quentes do ano, de janeiro a maio (86%). A maioria dos casos (n=10) ocorreu em visitantes das localidades

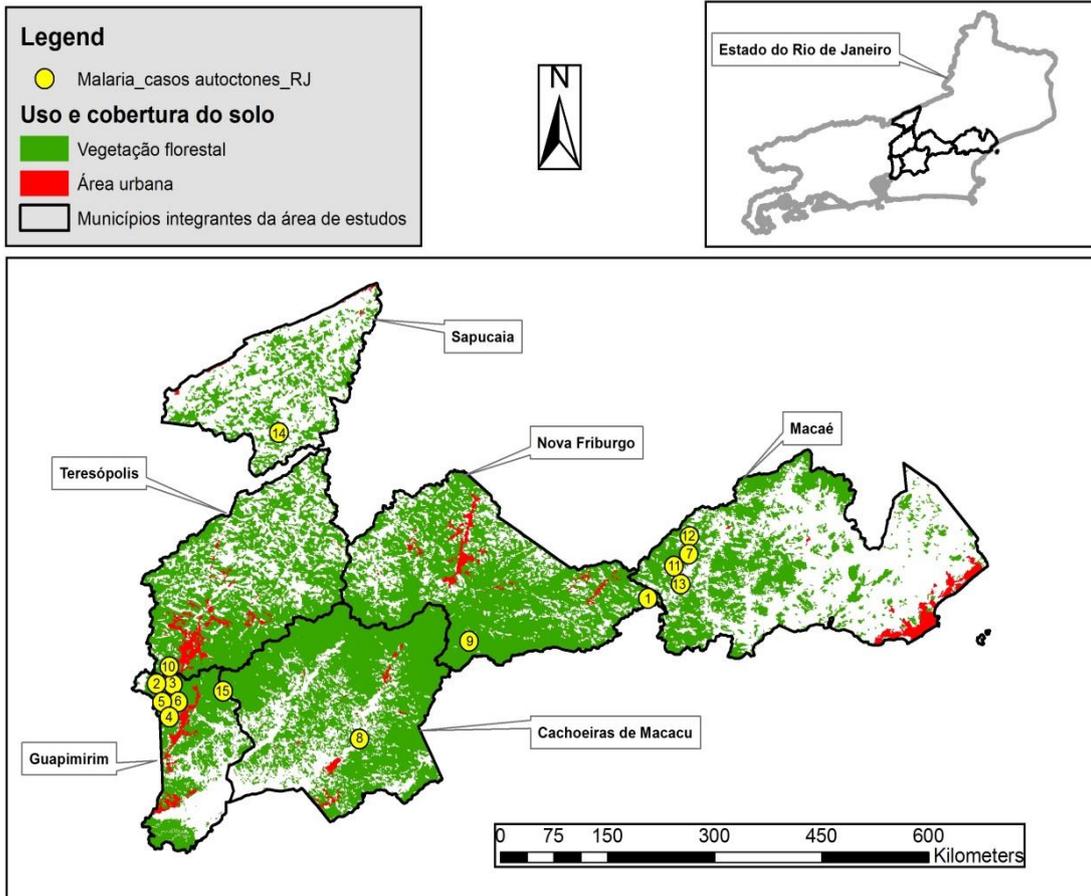
(71%). Dentre os visitantes, metade dos indivíduos (n=5) eram visitantes frequentes, e os demais (n=5) visitantes ocasionais ou esporádicos.

O provável local de infecção da maioria dos casos foi: Monte Olivette (três casos, 21%) e Garrafão (dois casos, 14%) ambas pertencentes ao município de Guapimirim, o que totalizou cinco casos (36%) neste município. Seguido da localidade do Sana (pertencente ao município de Macaé) – quatro casos (28,5%); Lumiar e Macaé de Cima (pertencentes ao município de Nova Friburgo) – um caso em cada localidade, totalizando dois casos nesse município (7%). Um caso foi adquirido na localidade de Santana de Japuíba, distrito de Cachoeiras de Macacu (7%). Outro caso foi adquirido no Parque Nacional da Serra dos Órgãos em área pertence ao município de Teresópolis. E um caso no município de Sapucaia (7%), no período.

Foram identificados no estudo dois focos com transmissão autóctone em áreas distintas, e por convenção foram nomeados *foco Macaé*, que inclui os casos identificados no distrito do Sana e *foco Guapimirim* (casos identificados nas localidades do Garrafão, Monte Olivette em Guapimirim e Serra dos Órgãos em Teresópolis).

Todos os casos ocorreram em áreas não urbanas, cobertas por vegetação florestal como pode ser observado nas figuras 6 e 7. As regiões podem também ser visualizadas pelas imagens de satélite (figura 8).

Figura 6 – Uso e cobertura do solo das localidades com casos autóctones de malária no estado do Rio de Janeiro



Os números sinalizados no mapa se referem aos casos de malária incluídos neste estudo. O ponto sinalizado com o número 15 aponta o local em que está localizado o Centro de Primatologia do estado do Rio de Janeiro (CPRJ).

Figura 7 – Uso e cobertura do solo das localidades com casos autóctones de malária

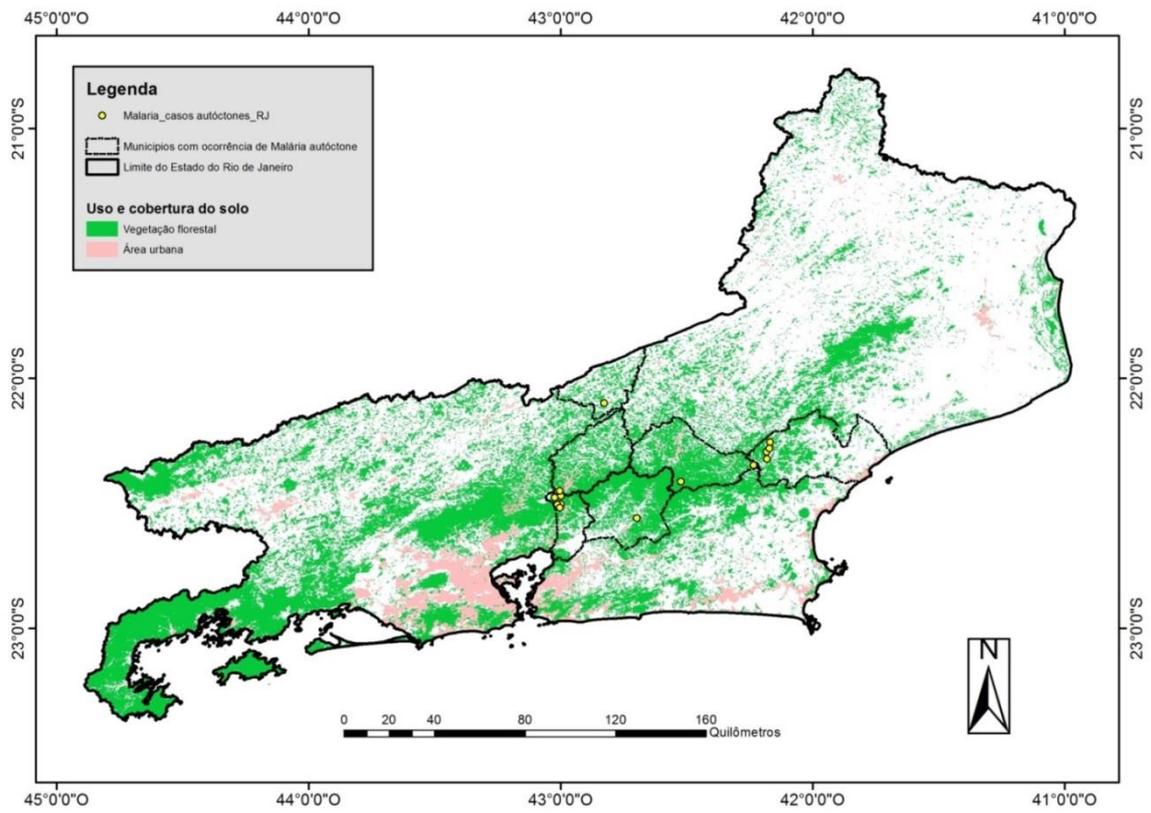
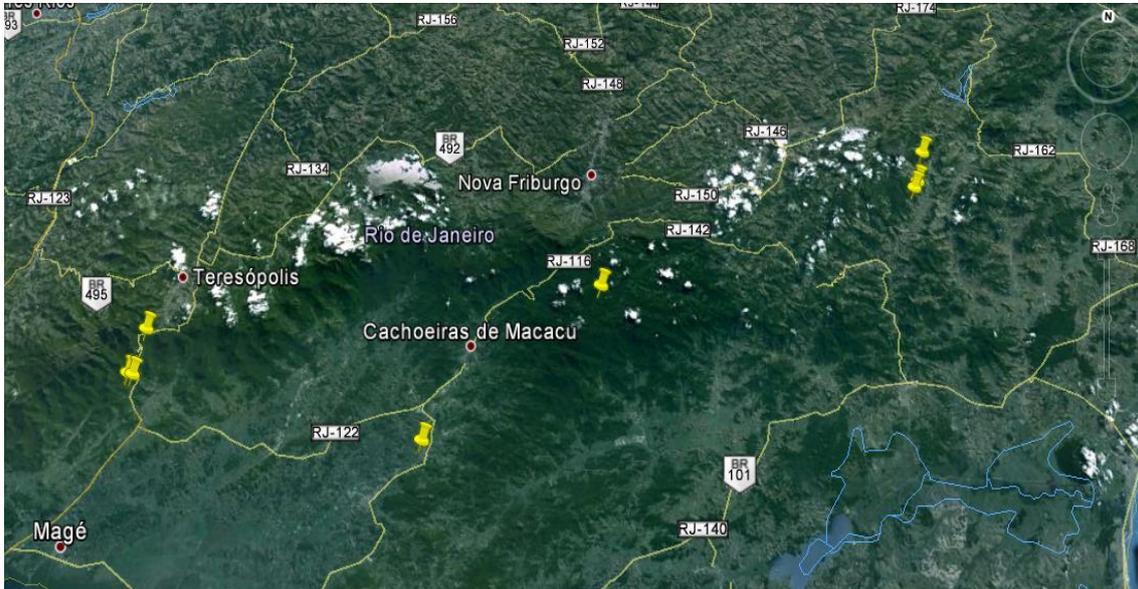
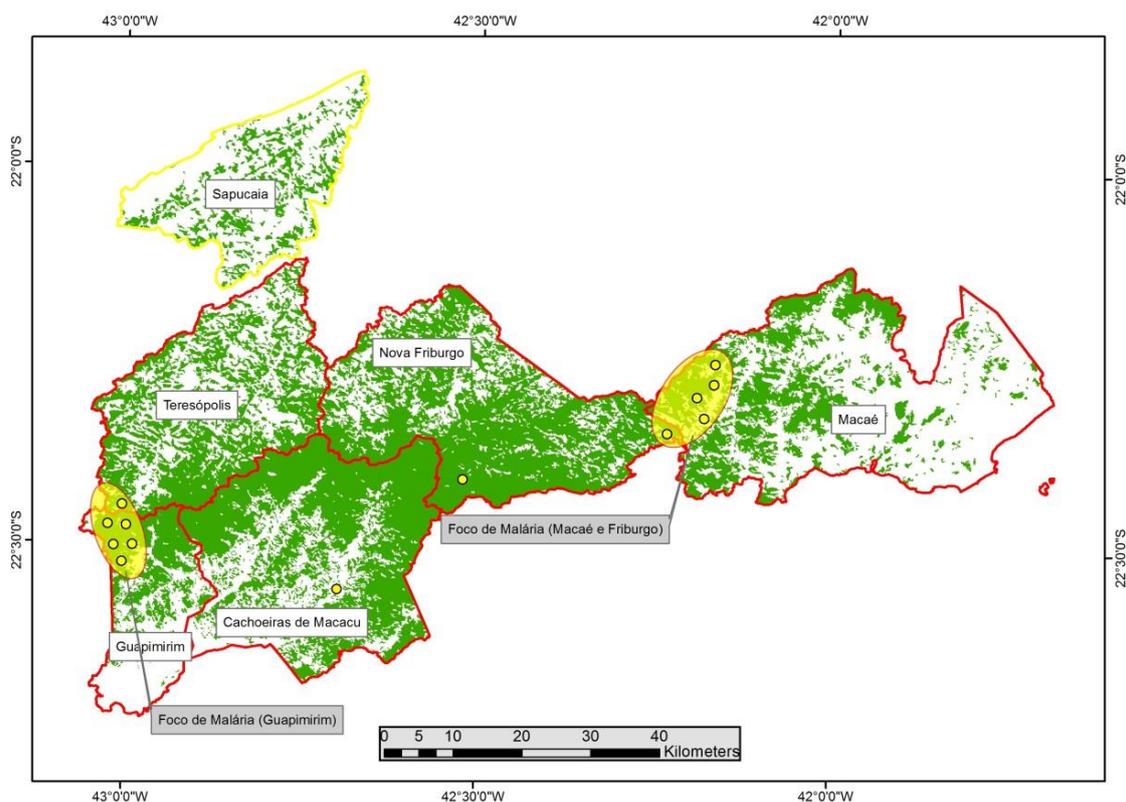


Figura 8 – Imagens de satélites das localidades com casos autóctones de malária no estado do Rio de Janeiro.



A figura 9 apresenta os focos de malária identificados neste estudo e faz uma delimitação dos municípios onde ocorreram os casos.

Figura 9 – Focos de malária autóctone identificados no estado do Rio de Janeiro e delimitação dos municípios com casos.



O cálculo da distância entre os pontos (locais prováveis de infecção e foco de casos) demonstrou que a distância mínima entre os casos foi de 24.3 km² para o caso de Lumiar (caso 1) ao caso de Cachoeiras de Macacu (caso 8) e a distância máxima foi encontrada entre os focos de Guapimirim e Macaé-Nova Friburgo (Sana-Lumiar), 79.7 km². A distância média entre os pontos calculados foi de 45 km², e a mediana 44 km².

No quadro 3 estão apresentadas as distâncias entre os pontos com casos de malária autóctone.

Quadro 3– Distâncias em quilômetros entre os pontos com casos de malária autóctone.

PONTO DE ORIGEM	PONTO DE DESTINO	DISTÂNCIA MÍNIMA*
Caso Cachoeiras de Macacu	Caso Nova Friburgo (Lumiar)	24.3
Foco Macaé-Friburgo	Caso Nova Friburgo (Lumiar)	30.4
Foco Guapimirim	Caso Cachoeiras de Macacu	32.1
Foco Guapimirim	Município de Sapucaia	34.6
Caso Nova Friburgo	Município de Sapucaia	40.6
Caso Cachoeiras de Macacu	Município de Sapucaia	47.4
Foco Guapimirim	Caso Nova Friburgo (Lumiar)	49.4
Foco Macaé-Friburgo	Caso Cachoeiras de Macacu	53.1
Foco Macaé-Friburgo	Município de Sapucaia	58.7
Foco Guapimirim	Foco Macaé-Friburgo	79.7

*distância calculada em km².

Foco Macaé - Casos 07, 11, 12 e 13.

Foco Macaé - Friburgo - Casos 07, 09, 11, 12 e 13.

Foco Guapimirim – Casos 02, 03, 04, 05 e 06.

Ao se analisar os casos identificados na região do Sana (foco Macaé) observou-se que a distância total entre os pontos foi de 7,40 km², conforme ilustrado no polígono a seguir (figura 10). Já a distância total entre os pontos dos casos identificados no foco Guapimirim foi de 6,54 km², conforme ilustrado no polígono (figura 11).

Figura 10– Representação da distância total e distância entre os casos de malária identificados na região do Sana.

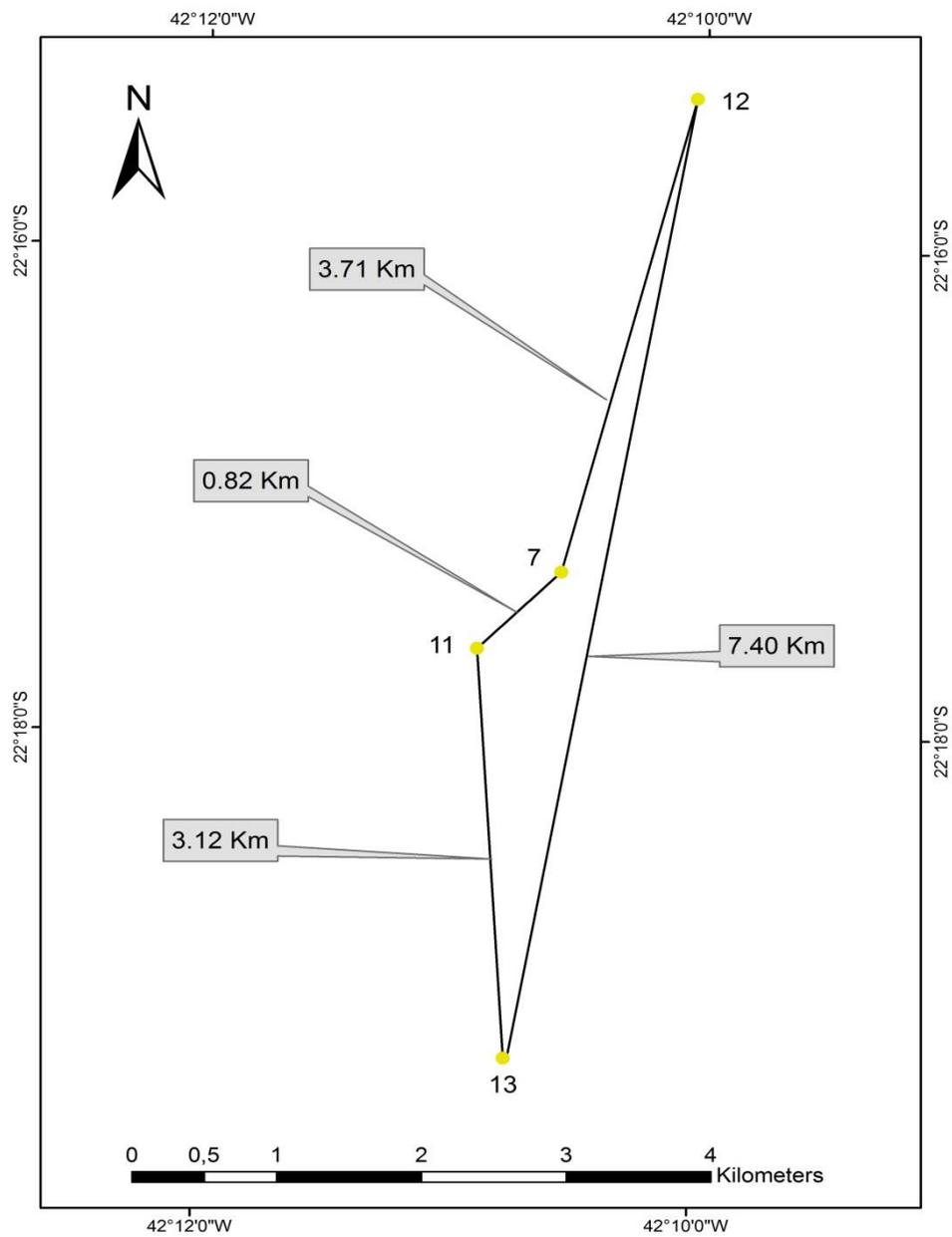
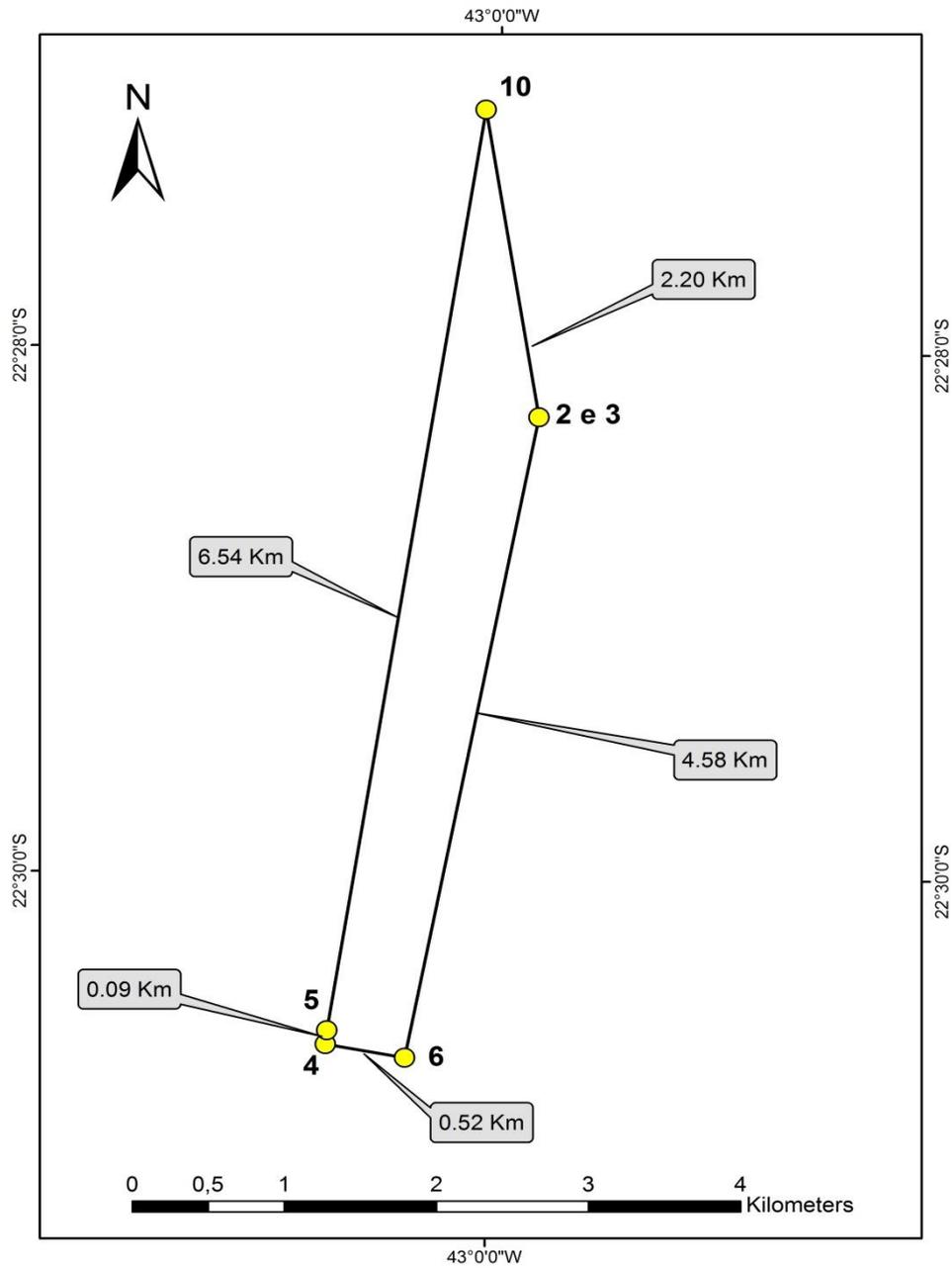


Figura 11– Representação da distância total e distância entre os casos de malária identificados na região de Guapimirim.



Descrição dos locais, formas de exposição e aspectos clínicos dos casos:

NOVA FRIBURGO – Lumiar

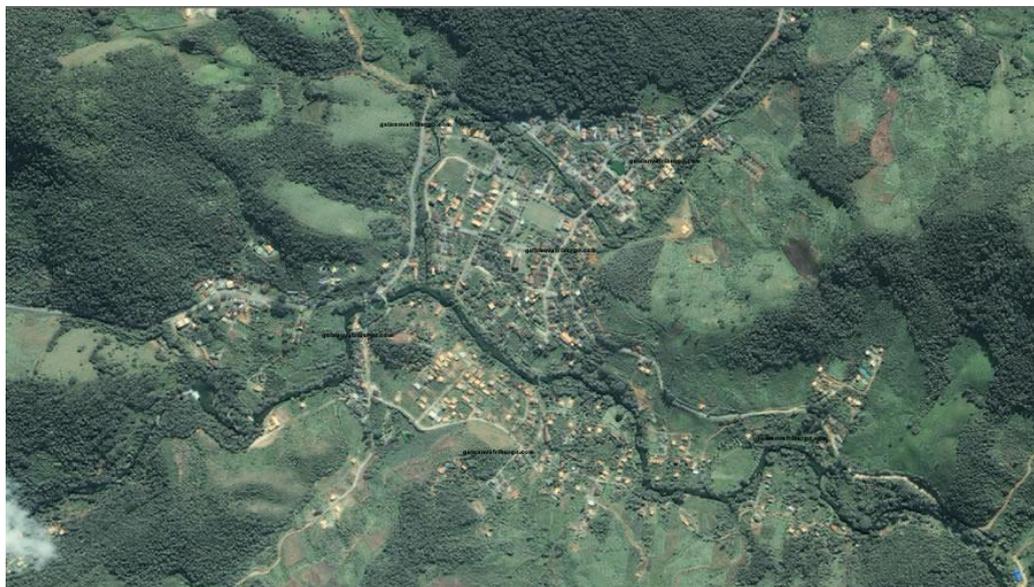
Caso 1 – Homem, 56 anos, médico, natural e residente na cidade do Rio de Janeiro, com história de visita esporádica na região de mata entre as localidades de Lumiar e Macaé de Cima para sucessivos passeios de bicicleta e *trekking*. Em virtude deste deslocamento e dos diversos momentos de exposição (em meados de abril de 2006), não foi possível identificar com precisão o tempo entre a exposição e o início dos sintomas e local provável em que a infecção foi adquirida.

A localidade de Lumiar tem cerca de 700 metros de altitude, está localizada na Mata Atlântica da serra fluminense e é o 5º distrito do município de Nova Friburgo. Faz fronteira com a localidade de Macaé de Cima. Segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INM), o clima local é do tipo superúmido, e a temperatura média anual é de 18°C, sendo janeiro, fevereiro e março os meses mais quentes, e junho, julho e agosto os meses mais frios.

É uma região turística que recebe um grande número de visitantes e também conta com um núcleo do movimento religioso intitulado *Santo Daime*. Os membros deste movimento em sua maioria são da cidade do Rio de Janeiro e Macaé (Oliveira DM, 2010) e circulam pela região Norte do Brasil.

Na figura 12, vista área da localidade de Lumiar, município de Nova Friburgo.

Figura 12 – Imagens de satélites da localidade de Lumiar, Nova Friburgo, RJ.



GUAPIMIRIM – Garrafão

Casos 2 e 3 – Uma mulher e um homem, com 28 e 27 anos respectivamente, biólogos, naturais e residentes na cidade do Rio de Janeiro, que realizaram trabalho de campo, com entradas sucessivas e pernoite em área de Mata Atlântica (Garrafão, Serra dos Órgãos, região serrana do estado do Rio de Janeiro). Também não foi possível identificar com precisão o local exato de exposição. As entradas em área de mata ocorreram no ano de 2008 nas seguintes datas: De 1 a 8 de fevereiro; 12 a 13 de fevereiro; 17 de fevereiro durante 24 horas; 03 de março também por 24 horas; e do dia 06 a 12 de março.

O período de incubação dos casos a contar da data da primeira exposição foi de 23 dias.

A região do Garrafão localiza-se entre os municípios de Guapimirim e Teresópolis, conta com residências esparsas e vegetação densa. Situada na base do Dedo de Deus, dentro dos limites do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (área de preservação ambiental), se estende ao longo de um grande vale, entre 800 e 400 metros

de altitude; tem sua entrada pela estrada Rio-Teresópolis e é o último bairro do município de Guapimirim. Na figura 13, vista área da localidade do Garrafão, onde observa-se nos arredores a estrada que liga os municípios de Guapimirim e Teresópolis.

Figura 13– Imagens de satélites da localidade do Garrafão, Guapimirim, RJ.



GUAPIMIRIM – Monte Olivette

Casos 4, 5 e 6 - série de casos de visitantes frequentes (veranistas) de um condomínio no bairro Monte Olivette em Guapimirim. Três homens, com 46, 54 e 79 anos, advogado, engenheiro e aposentado, respectivamente. Todos eram moradores e naturais da cidade do Rio de Janeiro e proprietários de casas de veraneio no condomínio. O caso nº 4 foi o primeiro relato de caso de malária nessa região e ocorreu em dezembro de 2009, seguindo-se os casos 05 (janeiro de 2010) e 06 (março de 2010). Devidos as exposições recorrentes, não foi possível precisar o período de incubação dos casos. A distância entre as casas não chegou a 2 km².

O Monte Olivette está localizado na estrada Rio-Teresópolis, entre os municípios de Guapimirim e Teresópolis, muito próximo ao Parque Nacional da Serra dos Órgãos. A área em que os casos ocorreram faz parte de um condomínio com 46 casas de alto padrão, frequentado em sua maioria durante férias escolares, feriados e finais de semana por turistas proprietários de casas, sendo poucos os moradores fixos do local; a maioria dos empregados reside em outros bairros e trabalha apenas durante temporadas. As casas, algumas delas cortadas por um pequeno córrego, foram construídas muito próximo à mata, onde há numerosas bromélias e relatos de presença esporádica de primatas não humanos.

MACAÉ DE CIMA – Sana

Casos 7, 11, 12 e 13 - série de casos de habitantes e visitantes (um frequente e outro esporádico) do Sana.

O **caso 7** foi diagnosticado em maio de 2011, sendo um indivíduo do sexo masculino, 44 anos, engenheiro, morador e natural da cidade do Rio de Janeiro, visitante frequente da região, que relatou história de viagem para a Cabeceira do Sana, no período de 20 de abril a 07 de maio. Este foi o primeiro caso identificado na região, nesta série de casos descritos neste trabalho.

Caso **11**, sexo feminino, 35 anos, dona de casa, natural e moradora da Cabeceira do Sana, início dos sintomas em 30 de janeiro de 2013.

Caso **12**, sexo feminino, 54 anos, dona de casa, natural e moradora da Cabeceira do Sana, início dos sintomas em 28 de fevereiro de 2013.

Caso **13**, sexo feminino, 22 anos, estudante, moradora e natural da cidade do Rio de Janeiro, visitante esporádica do Cabeceira do Sana, início dos sintomas em 05 de março de 2013, após história de viagem nos meses de janeiro e fevereiro de 2013.

A região do Sana é uma serra, e desde 2002 foi decretada Área de Proteção Ambiental. É o 6º e último distrito do município de Macaé; faz fronteira com os municípios de Trajano de Moraes e Nova Friburgo a oeste (Lumiar e Macaé de Cima) e

a leste com Casimiro de Abreu. É uma região turística que recebe um grande número de visitantes e tem uma população de aproximadamente três mil habitantes, divididos em três regiões distintas: Barra do Sana, Arraial do Sana (onde se encontra a maior parte da população) e Cabeceira do Sana. As moradias são muito próximas à mata fechada, com presença de numerosas bromélias na Cabeceira do Sana. A temperatura varia entre 18°C e 24°C na maior parte do ano e no inverno, a temperatura varia de 10°C à 18°C, segundo o INM. Na figura 14 é observa-se o local de exposição do caso 7, alto de um vale com altitude de 708 metros localizado na Cabeceira do Sana, local não frequentado por turistas.

Figura 14 – Local de exposição do caso 7



Vista do vale na Cabeceira do Sana (altitude de 708 metros)

CACHOEIRAS DE MACACU – Santana de Japuiba

Caso 8 – Homem, 66 anos, economista aposentado, natural da cidade do Rio de Janeiro, morador há cerca de um ano no condomínio Santa Helena em Santana de Japuiba, 1º distrito de Cachoeiras de Macacu.

O município de Cachoeiras de Macacu está localizado na porção centro-sul do estado do Rio de Janeiro, estendendo-se por uma superfície de 1055 km² numa faixa de contato entre o litoral e a Serra do Mar. É uma região de baixada, cercada pela Serra dos Órgãos e Serra do Mar. Faz fronteira com os municípios de Nova Friburgo, Guapimirim, Teresópolis, Rio Bonito, Itaboraí, Silva Jardim e Tanguá.

A cobertura florestal original do município era Mata Atlântica e foi retirada para a prática agrícola, utilização da madeira ou produção de lenha. A Mata Atlântica se estendia das áreas serranas até a baixada e hoje, está restrita às cristas de alguns morros e às encostas íngremes do município. No lugar da floresta surgiu uma vegetação secundária nas áreas mais baixas e uma floresta secundária, nas costas da Serra do Mar (Fortuna et al 2002).

As condições climáticas de Cachoeiras de Macacu são influenciadas pela disposição do relevo; as áreas de altitudes mais elevadas apresentam temperaturas mais amenas e pluviosidade mais acentuada. Na área de baixada do município, onde se localiza Santana de Japuiba (Fortuna et al 2002), as médias de temperatura são mais elevadas durante todo o ano, a temperatura média anual é de 21 °C (INM).

O paciente habita em um condomínio com cerca de 40 casas (figura 15); a maioria dos moradores é natural do município. A região não é próxima a matas e não conta com a presença de bromélias. Por se tratar de um morador da região, não foi possível estabelecer com precisão o período de incubação. Os sintomas iniciaram em 31 de julho de 2011.

Figura 15– Condomínio identificado como local provável de exposição do caso

8.



NOVA FRIBURGO – Macaé de Cima

Caso 9 – Mulher, 31 anos, professora, moradora e natural da cidade do Rio de Janeiro, visitante ocasional de uma casa em Macaé de Cima, muito próxima à mata, vizinha de um córrego, onde permaneceu durante três dias, de 06 a 08 de abril de 2012. O período de incubação a contar do primeiro dia de exposição foi de 22 dias. A região de Macaé de Cima, distrito de Nova Friburgo, é uma serra e está localizada entre Lumiar e Sana. O local apresenta moradias esparsas, muito próximas à mata, com numerosas bromélias (figura 16).

Figura 16 – Numerosas bromélias na vizinhança do local de exposição do caso

9.



TERESÓPOLIS – Parque Nacional da Serra dos Órgãos

Caso 10 – Homem, 36 anos, biólogo, natural da cidade do Rio de Janeiro, morador e funcionário do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Não foi possível estabelecer com precisão o período de incubação por se tratar de um morador da região, com diversos momentos de exposição. O início dos sintomas ocorreu em 07 de janeiro de 2013.

O Parque Nacional da Serra dos Órgãos está inserido ao longo de quatro dos municípios (Teresópolis, Petrópolis, Magé e Guapimirim), com áreas urbanas em torno de suas imediações. A população total desses municípios é de cerca de 700 mil habitantes. Teresópolis é o município mais fortemente associado ao parque e abriga a sede da unidade.

Por se tratar de uma área de preservação ambiental, formada por vegetação densa existem apenas poucas residências esparsas, contudo, é frequentado por turistas,

estudantes e pesquisadores. Apresenta clima tropical de altitude, superúmido (com 80 a 90% de umidade relativa do ar) com média anual variando de 13° a 23° C (não atingindo temperatura superior a 19°C nas áreas acima de 800m) e variação pluviométrica de 1.700 a 3.600mm, com concentração de chuvas no verão (dezembro a março) e período de seca no inverno (junho a agosto) (Plano de Manejo do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, 2009). Na figura 17, a sede do PARNASO em Teresópolis.

Figura 17 – Sede do PARNASO em Teresópolis, RJ.



SAPUCAIA

Caso 14 – Mulher, 51 anos, professora, moradora e natural da cidade do Rio de Janeiro, visitante frequente à uma fazenda em Sapucaia. Por conta dos diversos momentos de exposição, não foi possível determinar com exatidão o período de incubação do caso. Início dos sintomas em 19 de fevereiro de 2013.

Sapucaia está localizada na região do Médio Paraíba, limitando-se com o estado de Minas Gerais ao Norte, São José do Vale do Rio Preto ao Sul, Carmo e Sumidouro ao Leste e Três Rios a Oeste. No passado, a mata da região foi removida para o plantio de café e fabricação de carvão vegetal, o que causou grandes erosões no solo. Atualmente, no lugar das antigas matas predomina vegetação rasteira e relevo formado por áreas planas, onduladas e poucas montanhas. A altitude do município é de 221 metros e apresenta clima predominantemente tropical, com verões quentes e chuvosos e um inverno seco; com média anual 22°C variando de 17° a 32° C.

O quadro 4 sintetiza e apresenta as características epidemiológicas dos casos autóctones atendidos no período de 2006 a 2013.

Quadro 4– Características clínico-epidemiológica-laboratoriais dos casos autóctones atendidos no período de 2006 a 2013

<i>Caso</i>	<i>Ano</i>	<i>Mês do diagnóstico</i>	<i>Morador ou visitante</i>	<i>Entrada em área de Mata</i>	<i>Local provável de infecção</i>	<i>Altitude do local (metros)</i>	<i>Tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico (dias)</i>	<i>Nº de exames diretos até o diagnóstico</i>	<i>Diagnóstico inicial de dengue (clínico)</i>	<i>Espécie de plasmódio (gota espessa e distensão sanguínea)</i>	<i>Parasitemia</i>	<i>Exame molecular (PCR)</i>	<i>Teste rápido</i>
1 G	2006	Maio	Visitante esporádico	Sim	Lumiar	NR	SI	-	SI	<i>P.vivax</i>	1.320p/mm ³	NR	NR
2 P	2008	Março	Visitante esporádico	Sim	Serra dos Órgãos	730m	14	02	Não	<i>P.vivax</i>	16p/mm ³	Detectado (<i>P.vivax</i>)	NR
3 H	2008	Março	Visitante esporádico	Sim	Serra dos Órgãos	730m	28	02	Sim	<i>P.vivax</i>	(+2)*	NR	Negativo
4 N	2009	Dezembro	Visitante frequente	Não	Monte Olivette	280 m	14	02	Não	<i>P.vivax</i>	(+2)*	NR	NR
5 R	2010	Janeiro	Visitante frequente	Não	Monte Olivette	330 m	28	02	Sim	<i>P.vivax</i>	(+2)*	NR	NR
6 R	2010	Março	Visitante frequente	Não	Monte Olivette	340 m	10	03	Sim	<i>P.vivax</i>	500 p/mm ³	Detectado (<i>P.vivax</i>)	NR
7 H	2011	Maio	Visitante frequente	Sim	Cabeceira do Sana	735m	15	05	Sim	**	**	Detectado (<i>P.vivax</i>)	Negativo
8 L	2011	Agosto	morador	Não	Santana de Japuiba	160m	14	02	Sim	<i>P.vivax</i>	5.880 p/mm ³	Detectado (<i>P.vivax</i>)	Positivo
9 C	2012	Maio	Visitante esporádico	Sim	Macaé de Cima	1004 m	15	02	Sim	<i>P.vivax</i>	400p/mm ³	Detectado (<i>P.vivax</i>)	Negativo
10 G	2013	Janeiro	morador	Sim	Serra dos Órgãos/Teresópolis	1300m	18	02	Não	<i>P.vivax</i>	112 p/mm ³	Detectado (<i>P.vivax</i>)	Negativo
11 M	2013	Fevereiro	morador	Sim	Cabeceira do Sana	393m	09	00***	Não	<i>P.vivax</i>	592 p/mm ³	Detectado (<i>P.vivax</i>)	Negativo
12 Z	2013	Março	morador	Não	Cabeceira do Sana	622m	21	00***	Não	<i>P.vivax</i>	920 p/mm ³	Detectado <i>P.vivax</i> e <i>P.falciparum</i>	Positivo
13 P	2013	Março	Visitante esporádico	Sim	Cabeceira do Sana	335m	10	02	Sim	<i>P.vivax</i>	288 p/mm ³	Detectado (<i>P.vivax</i>)	Negativo
14 A	2013	Março	Visitante frequente	Não	Sapucaia	SI	18	03	Sim	<i>P.vivax</i>	(+2)*	Detectado (<i>P.vivax</i>)	NR

SI= Sem informação - NR= Exame não realizado no momento do diagnóstico. *Exame realizado pelo LACEN . ** Sem exame microscópico positivo.

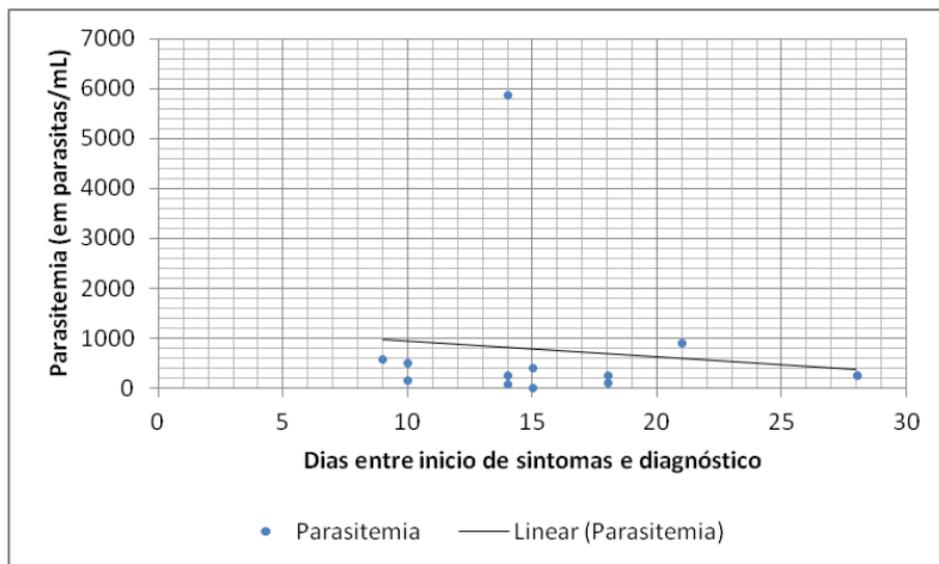
*** Diagnóstico realizado no primeiro exame direto.

As letras ao lado dos números representam a letra inicial de cada paciente.

Tempo entre o início dos sintomas e diagnóstico

O tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 16 dias, mediana de 15 dias [9-28]. Dos treze indivíduos com informação do tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico, nenhum recebeu o diagnóstico de malária em período < 48 horas. Seis indivíduos (46%) receberam o diagnóstico de malária em até 14 dias entre o início dos sintomas e o diagnóstico e sete (54%) receberam diagnóstico entre o 15 e 28 dias após o início dos sintomas. O gráfico abaixo apresenta a correlação entre o início dos sintomas e o diagnóstico (p valor = 0,6630).

Gráfico 2 – Correlação entre o início dos sintomas e o diagnóstico e a parasitemia dos casos



Parâmetro - Parasitemia
Número testado - n= 13
Correlação de Spearman r - 0,1338
Intervalo de confiança 95% - 0.6486 to 0.4650
P valor - 0,6630

Características clínicas dos casos

A maioria dos casos era do sexo masculino, n=8 (57%) e a mediana de idade 45 anos [22-79 anos]. Entrada em área de mata fechada foi descrita por oito indivíduos (57%). Quatro indivíduos apresentavam comorbidades (28,5%): hipertensão arterial sistêmica (n=4), HIV (n=1), diabetes mellitus (n=1), neoplasia de próstata (n=1), doença coronariana (n=1), e obesidade (n=1).

Todos os pacientes no estudo apresentaram febre (100%), queixa principal em 85% dos indivíduos que foi também o principal motivo para a procura de atendimento médico (n=12/14). Todos os casos apresentaram síndrome febril: febre acompanhada de cefaleia, mialgia, fraqueza, indisposição e sensação de cansaço. A maioria dos casos recebeu diagnóstico clínico inicial de dengue (61,5%). Em 12 casos (86%) a febre inicialmente contínua tornou-se periódica (terçã) após uma mediana de nove dias. Em dois casos a febre permaneceu diária até o diagnóstico, 15 e 18 dias após o início da sintomatologia. Em sete casos (50%) houve sintomas no período *interfebre*, período caracterizado como o intervalo de tempo sem febre. Os mais referidos foram: cefaleia intensa, prostração, mialgia, artralgia e anorexia.

A tríade clássica da malária, composta por calafrios, febre e sudorese foi referida por 93% dos casos (n=13), já a prostração intensa foi referida por 64% (n=9). Metade dos entrevistados observou emagrecimento durante o tempo da doença (cerca de 5% do peso corporal).

Dados do exame físico, como icterícia, esplenomegalia e hepatomegalia estiveram presentes 43%, 42% e 46% dos casos, respectivamente. Dois indivíduos (14%) apresentaram sangramento ativo (epistaxe, hematúria, e hematoquezia). Dois pacientes apresentaram confusão mental e um paciente apresentou delírios.

Quatro pacientes foram hospitalizados: três para investigação diagnóstica de febre de evolução subaguda, sem foco e um em decorrência de complicação da malária (confusão mental, lipotimia, sangramento, icterícia, trombocitopenia), cuja internação durou seis dias. Não houve óbito associado à malária. Todos os casos foram diagnosticados como malária por *P. vivax* a exceção do caso 12 que teve infecção mista (*P. vivax* e *P. falciparum*).

As principais características clínicas dos casos de malária autóctone atendidos no período de 2006 a 2013 estão descritos no quadro 5.

Quadro 5 – Características clínicas dos casos de malária autóctones da Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro.

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Caso 8	Caso 9	Caso 10	Caso 11	Caso 12	Caso 13	Caso 14
<i>Sexo</i>	M	F	M	M	M	M	M	M	F	M	F	F	F	F
<i>Idade</i>	56	28	27	54	46	79	44	66	31	36	35	54	22	51
<i>Comorbidades</i>	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
<i>Imunodepressão</i>	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
<i>Tempo entre o início dos sintomas e diagnóstico</i>	SI	14	28	14	28	10	15	14	15	18	09	21	10	18
<i>Quadro clínico inicial inespecífico</i>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Tipo de febre</i>	terça	terça	terça	terça	terça	terça	diária	terça	terça	terça	terça	terça	terça	diária
<i>Sintomas no período interfebre</i>	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim
<i>Tríade clássica¹</i>	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Prostração intensa</i>	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim
<i>Diarréia</i>	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
<i>Emagrecimento</i>	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim

<i>Icterícia</i> clínica	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
<i>Esplenomegalia</i>	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
<i>Hepatomegalia</i>	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
<i>Sangramento ativo</i> ²	Não	Sim epistaxe	Não	Não	Não	Não	Sim gengivorragia	Sim melena	Não	Não	Não	Não	Não	Não
<i>Confusão mental</i> ³	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
<i>Internação hospitalar</i>	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não

1- Calafrios, febre e sudorese.

2- Sangramento ativo – Epistaxe, gengivorragia e melena

3- Confusão mental e delírios.

As características clínicas e laboratoriais que indicam malária grave por *P. falciparum* (OMS, 2008) foram utilizadas neste estudo também para definir os casos de malária grave por *P. vivax*, em função da inexistência de critérios bem definidos para a infecção por esta espécie até o presente momento. Nenhum dos casos precisou de internação em unidade de terapia intensiva (UTI), nem apresentou distúrbio ácido básico, malária cerebral, insuficiência renal aguda (IRA), edema aguda de pulmão, choque hipovolêmico ou hiperparasitemia (> 100.000 p/mm³). O quadro 6 apresenta alguns dos parâmetros clínicos e laboratoriais desses pacientes.

Quadro 6 – Parâmetros clínicos e laboratoriais utilizados para identificação de casos com gravidade

Parâmetro	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Caso 8	Caso 9	Caso 10	Caso 11	Caso 12	Caso 13	Caso 14
Espécie parasitária	<i>P.v</i>	<i>P.v</i>	<i>P.v</i>	<i>P.v</i> + <i>Pf</i>	<i>P.v</i>	<i>P.v</i>								
Idade	56	28	27	54	46	79	44	66	31	36	35	54	22	51
Sexo	M	F	M	M	M	M	M	M	F	M	F	F	F	F
Valor de Hemoglobina (g/dL) ¹	SI	12.7	SI	SI	SI	15.6	11.9	9.4	9.6	14.9	11.8	12.5	12.6	12.9
Sangramento ativo ²	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Plaquetas ³	SI	232.000	SI	SI	SI	414.000	259.000	226.000	123.000	126.000	191.000	62.000	172.000	398.000
TGO ⁴	SI	21	SI	SI	SI	18	45	92	23	24	22	31	33	19
TGP ⁵	SI	36	SI	SI	SI	35	129	79	52	50	70	36	50	47
Bilirrubina Total ⁶	SI	0.15	SI	SI	SI	SI	0.29	5,9	0.94	0.64	1.0	0.61	1.04	0.25

1. Valor de Hemoglobina (g/dL): Anemia Grave – Hemoglobina (Hb g/dL) < 7g/dL ; Anemia – Hemoglobina (Hb g/dL) < 12g/dL
2. Sangramento espontâneo não vaginal ou Coagulação Intravascular Disseminada (CID)
3. Valor das plaquetas - Plaquetopenia < 150.000 ; Plaquetopenia grave < 50.000
4. Transaminase/TGO (AST) UI/l aumentada > 144 UI/l
5. Transaminase/TGP (ALT) UI/l aumentada > 150 UI/l
6. Bilirrubina Total mg/dL aumentada > 3,0 mg/dL

Ao analisar os parâmetros laboratoriais, observa-se que nenhum indivíduo apresentou anemia grave (Hb/g/dL <7g/dL), contudo, dos dez pacientes com dados disponíveis, quatro (40%) apresentaram anemia (Hb/g/dL <12g/dL). Trombocitopenia esteve presente em três (30%) dos dez pacientes com dados disponíveis. Nenhum paciente apresentou trombocitopenia grave. Nenhum apresentou aumento de transaminases (TGO e TGP). Todos os pacientes tiveram o diagnóstico de dengue afastado pela realização de sorologia específica (ELISA- IgM).

Diagnóstico

As lâminas (gota espessa e distensão sanguínea) de todos os casos foram analisadas, incluindo as do momento do diagnóstico e dos controles de cura que ainda se apresentavam positivas, com exceção do caso 7, que nunca teve exame direto positivo. No exame das lâminas dos pacientes, foram observadas todas as formas evolutivas: anéis (trofozoítos jovens), formas irregulares (trofozoítos maduros), esquizontes e gametócitos.

Em 13 dos 14 casos (93%), a espécie visualizada no exame direto foi *P.vivax*. Em um indivíduo (caso 7), apesar da sintomatologia, o exame direto não foi positivo, mesmo após pesquisas consecutivas. O diagnóstico presuntivo baseado no padrão terçã da febre e na ativação policlonal foi confirmado pelo exame molecular positivo (Brasil P. et al, 2013).

Em 10 casos (71%) a parasitemia foi inferior a 300 parasitos/ mm³ (+/2). O exame molecular detectou *P. vivax* em 13 casos (93%). Em uma amostra o exame molecular detectou infecção mista (*P. vivax* e *P. falciparum*).

Das oito amostras que foram submetidas ao teste rápido, seis (75%) foram negativas, com parasitemia (determinada pela gota espessa) variando de indetectável ao exame direto a 592 parasitos/ mm³ (vide quadro 3).

Características morfológicas

A análise microscópica das lâminas dos indivíduos incluídos foi realizada por dois microscopistas experientes de forma cega. Baseados na morfologia dos parasitas e na exclusão de *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. falciparum*, o resultado do exame de todos os casos foi *P. vivax*, já que o encontrado se assemelha mais a esta espécie. Fenotipicamente, as amostras analisadas se apresentavam de forma atípica do comumente observado em amostras de *P. vivax* de indivíduos oriundos da região endêmica brasileira, com exceção da lâmina do caso 8.

As principais características observadas estão descritas abaixo.

As **hemácias** infectadas eram jovens e estavam levemente aumentadas, com morfologia preservada;

Os **linfócitos** apresentavam-se de tamanho pequeno (micro-lymfocito) com diâmetro semelhante ao do glóbulo vermelho.

Os trofozoítos jovens tinham massa de cromatina maior e ausência de pigmento malárico.

Os trofozoítos maduros tinham o citoplasma bem mais compactado.

Os esquizontes, quando maduros, tinham um número de merozoítos variando de 8 a 12, e irregularmente arranjados.

Os gametócitos eram menores e mais compactos, com granulação difusa e mais escura.

Acompanhamento:

Ao se analisar oito, dos 14 indivíduos incluídos no estudo, observou-se que o exame direto tornou-se negativo entre 24 e 48 horas após o início do tratamento. Os demais indivíduos foram acompanhados após este período. Até ao final desse estudo nenhum dos indivíduos incluídos no estudo apresentou episódios de recaída.

Caracterização molecular dos parasitas a partir da análise de fragmentos e caracterização do receptor DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines) dos pacientes

Dez das quatorze amostras de pacientes (71%) com malária incluídos no estudo tiveram seus parasitas caracterizados molecularmente a partir da análise de fragmento do DNA do *Plasmodium*. Microssatélites de 10 loci e dois blocos polimórficos da MSP-1 (Blocos 2 e 10) foram buscados. Além disso, também se pesquisou o antígeno Duffy/DARC dos pacientes, uma vez que a principal via de invasão do *P.vivax* no eritrócito humano é através da interação entre a *Duffy binding protein* (PvDBP) do *Plasmodium* e o seu receptor no eritrócito, o antígeno do grupo sanguíneo Duffy/receptor de quimiocinas (DARC).

O resultado da genotipagem dos microssatélites de *P.vivax* das amostras humanas evidenciou que alguns marcadores testados apresentam alelos que são naturalmente observados também em primatas não humanos, e vários outros foram descritos pela primeira vez em infecção humana.

Em relação ao antígeno do grupo sanguíneo Duffy/receptor de quimiocinas (DARC), das dez amostras humanas testadas, uma apresentava perfil Fy*A/Fy*A (10%), três (30%) perfil Fy*B/Fy*B e quatro (40%) perfil Fy*A/Fy*B (quadro 7).

Quadro 7 – Caracterização molecular dos parasitos de amostras humanas a partir da análise de fragmentos e caracterização do receptor DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines) dos pacientes.

CASO	MARCADOR							
	Foco Guapimirim/Teresópolis							
	LOCAL	MS1	MS5	MS6	MS7	MSP1b12	MSP1b110	DARC
02	Garrafão	236*	182**	194	361	397	372	Fy*B/Fy*B
04	Monte Olivette	222*	185**	200	349	397	224 e 372	Fy*A/Fy*B
05	Monte Olivette	222*	179**	200	367	154	224	Fy*A/Fy*B
10	Teresópolis	236*	179**	197	352	397	362	Fy*A/Fy*B
Cachoeiras de Macacu								
08	Santana de Japuiba	242*	179**	209	361	397 e 411	224	Fy*B/Fy*B
Foco Sana/Macaé de Cima								
07	Sana	222* e 236*	182**	200	352	397	362	Fy*A/Fy*A
11	Sana	236*	182**	194	352	397	362	Fy*B/Fy*B
12	Sana	236*	182**	197	352	397	362	X
13	Sana	222*	182**	194	352	397	362	X
09	Macaé de Cima	222*	185**	200	349	397	224	Fy*A/Fy*B

*Alelo novo, nunca detectado anteriormente em humanos e/ou primatas.

** Alelos identificados em primatas não humanos em estudo conduzido no município de Indaial, Santa Catarina.

Alelos já descritos em amostras humanas

Alelos comuns a humanos e primatas, identificados até o momento, apenas neste estudo.

X Alelo que não funcionou

RESPOSTA IMUNE

Foram testadas 46 amostras de 11 dos 14 casos incluídos no estudo. Cada caso teve amostras coletadas nos tempos dos controles de cura, variando entre o dia 12 até o dia 176 pós início dos sintomas. Para o caso 5 foram testadas também amostras de quatro anos e meio (54 meses) após o diagnóstico de malária.

As amostras foram testadas para formas eritrocitárias de *P.vivax* (ELISA MSP1₁₉), para formas pré eritrocitárias de *P.vivax*, *P.malariae/brasilianum* e *P.falciparum* (CSP de *P.vivax* e suas variantes (clássica (variante VK 210), like e VK 247), CSP de *P.malariae/brasilianum* e de *P.falciparum*). Amostras positivas para CSP de *P.falciparum* também foram testadas para MSP3 e GLURP. Os valores estão expressos em Índice de Reatividade (IR).

O título máximo de anticorpos anti-MSP1₁₉ encontrado foi 6400, o mínimo 100 (143º dia de doença), título médio 2687, mediana 800. Já na IFI, das 40 amostras testadas, 77,5% (n= 31) foram positivas, e o título máximo encontrado foi de 1:3200.

Em relação às variáveis de CSP de *P.vivax*, 10 dos 11 indivíduos incluídos (91%), tiveram pelo menos uma amostra positiva para variante VK 210, cinco indivíduos (45%) tiveram pelo menos uma amostra positiva para variante vivax-like e cinco indivíduos (45%) tiveram pelo menos uma amostra positiva para variante VK 247. Na pesquisa de CSP de *P.malariae/brasilianum*, quatro indivíduos tiveram pelo menos uma amostra positiva (36%). Na pesquisa de CSP para *P.falciparum*, oito indivíduos (73%) tiveram pelo menos uma amostra positiva, ao serem testados para MSP3 também oito indivíduos (73%) tiveram pelo menos uma amostra positiva, na pesquisa do antígeno GLURP, sete indivíduos (64%) tiveram pelo menos uma amostra positiva. O quadro 8 apresenta os resultados de sorologia dos pacientes incluídos no estudo.

Quadro 8 - Resultado da sorologia dos pacientes incluídos no estudo

CASO 2 – GARRAÇÃO - GUAPIMIRIM										
DIAS DE DOENÇA	<i>P. vivax</i>						<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>		
	MSP1-19	Título MSP1-19	IFI	VK 210 Clássica	LIKE	VK 247		CSP de falciparum	MSP 3 P.falciparum	GLURP P.f
16	10,80035	1:1600	1:200	0,923928	0,666256	0,727791	0,573918	1,550259	NR	NR
30	11,17306	1:400	1:200	1,158941	0,819009	0,867736	0,826874	2,133073	2,007049	2,123787
63	8,834419	1:100	NEG	0,962944	0,974124	0,925182	0,863814	1,148578	0,888075	1,022564
CASO 4 – MONTE OLIVETTE - GUAPIMIRIM										
DIAS DE DOENÇA	MSP1-19	Título MSP1-19	IFI	VK 210 Clássica	LIKE	VK 247	<i>P. malariae</i>	CSP de falciparum	MSP 3 P.falciparum	GLURP P.f
133	2,764596	1:400	NEG	1,169744	0,906211	0,900677	0,762567	0,761435	NR	NR
176	1,744767	1:200	NEG	0,748749	0,658598	0,624618	0,555319	0,572445	NR	NR
CASO 5 – MONTE OLIVETTE - GUAPIMIRIM										
DIAS DE DOENÇA	MSP1-19	Título MSP1-19	IFI	VK 210 Clássica	LIKE	VK 247	<i>P. malariae</i>	CSP de falciparum	MSP 3 P.falciparum	GLURP P.f
68	8,600965	1:800	1:100	0,66116	0,477356	0,563272	0,435752	0,807997	NR	NR
98	6,778379	1:1600	1:100	0,545315	0,421196	0,521444	0,422467	0,514927	NR	NR
54 MESES	NR	NR	NR	2,164493	0,623563	0,613765	0,70469	0,641937	1,272907	1,616875
54,5 MESES	NR	NR	NR	2,070755	0,670098	0,644	0,616604	0,728296	1,539329	2,088828

CASO 6 – MONTE OLIVETTE - GUAPIMIRIM										
DIAS DE DOENÇA	MSP1-19	Título MSP1-19	IFI	VK 210 Clássica	LIKE	VK 247	<i>P.malariae</i>	CSP de <i>falciparum</i>	MSP 3 <i>P.falciparum</i>	GLURP <i>P.f</i>
11	NR	NR	NR	0,587992	0,611154	0,556319	0,846765	0,532549	0,858472	4,199505
18	NR	NR	NR	0,920336	0,859339	0,798197	0,696166	0,780112	1,740626	4,173285
CASO 8 – SANTANA DE JAPUIBA – CACHOEIRAS DE MACACU										
DIAS DE DOENÇA	MSP1-19	Título MSP1-19	IFI	VK 210 Clássica	LIKE	VK 247	<i>P.malariae</i>	CSP de <i>falciparum</i>	MSP 3 <i>P.falciparum</i>	GLURP <i>P.f</i>
14	6,90125	1:800	1:800	1,516849	0,980329	0,774009	0,87518	1,321296	5,784327	1,27602
15	4,894358	1:800	1:400	0,856117	0,834735	0,875581	0,698798	0,851821	NR	NR
18	4,591277	1:800	1:200	0,782655	0,694336	0,627406	0,595174	0,673787	NR	NR
28	3,182357	1:800	1:100	1,025436	0,451829	0,45731	0,446381	0,443714	4,03778	1,162402
89	1,758426	1:800	NEG	0,939526	0,788581	0,710749	0,562977	0,634348	NR	NR
143	1,012564	1:100	NEG	1,012564	0,933178	0,826915	0,575772	0,71294	NR	NR
CASO 9 – MACAÉ DE CIMA – NOVA FRIBURGO										
DIAS DE DOENÇA	MSP1-19	Título MSP1-19	IFI	VK 210 Clássica	LIKE	VK 247	<i>P.malariae</i>	CSP de <i>falciparum</i>	MSP 3 <i>P.falciparum</i>	GLURP <i>P.f</i>
15	6,786571	1:6400	1:800	0,796782	0,635624	0,970389	0,608459	7,562305	5,890896	6,865164
16	9,15376	1:6400	1:800	0,974306	0,986533	1,103567	0,806984	5,181555	6,092192	6,865164
17	6,884532	1:6400	1:800	0,855003	0,83452	0,943323	0,713215	5,760162	6,127715	6,690366

22	6,774284	1:6400	1:800	0,982828	0,974124	1,139849	0,943375	5,483812	4,351566	5,541074
29	6,819336	1:3200	1:800	0,72332	0,656045	0,925773	0,478265	4,683644	NR	NR
42	5,693019	1:1600	1:800	1,138664	0,99045	1,268755	0,648315	4,574085	NR	NR
78	5,693019	1:800	1:400	1,138664	0,99045	1,268755	0,613773	2,380168	NR	NR
CASO 10 – PARQUE NACIONAL DA SERRA DOS ÓRGÃOS – TERESÓPOLIS										
DIAS DE DOENÇA	MSP1-19	Título MSP1-19	IFI	VK 210 Clássica	LIKE	VK 247	<i>P.malariae</i>	CSP de <i>falciparum</i>	MSP 3 <i>P.falciparum</i>	GLURP <i>P.f</i>
12	12,54922	NEGATIVO	1:200	0,921103	0,816866	0,922985	0,860877	1,049027	NR	NR
17	NR	NR	NR	1,15326	1,154058	0,919135	0,826874	1,430685	6,098113	4,107736
22	9,223511	1:6400	1:3200	0,700716	0,610097	0,593945	0,480922	1,49274	NR	NR
CASO 11 – CABECEIRA DO SANA – MACAÉ										
DIAS DE DOENÇA	MSP1-19	Título MSP1-19	IFI	VK 210 Clássica	LIKE	VK 247	<i>P.malariae</i>	CSP de <i>falciparum</i>	MSP 3 <i>P.falciparum</i>	GLURP <i>P.f</i>
9	7,478744	1:6400	1:400	0,84199	0,694336	1,162793	0,866191	2,067925	NR	NR
15	8,596869	1:6400	1:200	1,169744	1,069584	2,79405	1,830692	6,403719	NR	NR
CASO 12 – CABECEIRA DO SANA – MACAÉ										
DIAS DE DOENÇA	MSP1-19	Título MSP1-19	IFI	VK 210 Clássica	LIKE	VK 247	<i>P.malariae</i>	CSP de <i>falciparum</i>	MSP 3 <i>P.falciparum</i>	GLURP <i>P.f</i>
25	11,71681	1:3200	1:800	2,409122	1,062394	1,194412	1,087569	1,406232	NR	NR
35	8,394337	1:3200	1:200	0,825259	0,709175	0,719597	0,703721	0,923454	NR	NR
42	10,19345	1:3200	1:400	0,717341	0,575007	0,595732	0,629511	0,721361	NR	NR

77	6,993021	1:800	1:800	1,104971	0,772152	0,943733	0,611598	1,021694	1,237384	0,742888
119	4,452023	1:800	1:200	0,627254	0,543726	0,593945	0,515463	0,515463	NR	NR
150	NR	NR	NR	1,303809	0,791088	0,683305	0,699007	0,679359	NR	NR
CASO 13 – CABECEIRA DO SANA – MACAÉ										
DIAS DE DOENÇA	MSP1-19	Título MSP1-19	IFI	VK 210 Clássica	LIKE	VK 247	<i>P.malariae</i>	CSP de <i>falciparum</i>	MSP 3 <i>P.falciparum</i>	GLURP <i>P.f</i>
10	9,66175	1:6400	1:800	1,602041	1,107874	2,032797	0,799765	3,026565	NR	NR
14	9,620793	1:6400	1:100	1,667026	1,02874	2,345106	0,749282	5,119141	NR	NR
21	10,43755	1:6400	1:100	3,316907	1,555257	4,046257	1,760583	6,840296	NR	NR
28	8,986506	1:6400	1:100	0,961744	0,692747	0,979123	0,593872	1,218173	1,355794	1,713013
35	10,06236	1:3200	1:100	1,275978	0,999417	1,330074	0,862379	1,894624	NR	NR
42	0,474639	1:3200	1:800	0,815737	0,684532	0,663562	0,493884	0,502426	NR	NR
CASO 14 – SAPUCAIA										
DIAS DE DOENÇA	MSP1-19	Título MSP1-19	IFI	VK 210 Clássica	LIKE	VK 247	<i>P.malariae</i>	CSP de <i>falciparum</i>	MSP 3 <i>P.falciparum</i>	GLURP <i>P.f</i>
21	1,116533	1:100	NEG	1,720348	1,716807	1,825534	1,215519	1,723406	NR	NR
25	1,039686	1:100	NEG	1,479118	1,516924	1,48638	0,941707	0,97117	NR	NR
35	1,039686	1:100	NEG	0,803873	0,623563	0,73168	0,528518	0,538306	0,603891	0,384554
42	9,38882	1:100	NEG	0,910959	0,835129	0,775631	0,690926	0,906613	NR	NR
77	4,316958	1:100	1:100	0,634815	0,575007	0,580986	0,48109	0,547336	NR	NR

As amostras grifadas tiveram $IR > 1$.

NEG = NEGATIVO

NR= NÃO REALIZADO

INQUÉRITO

Características clínico-epidemiológicas da população exposta, vizinha aos casos

A busca ativa para realização de inquérito sorológico e molecular nas localidades de onde provinham os casos de malária autóctone resultou na avaliação de 220 indivíduos, conforme o exposto na tabela 3.

Tabela 3 – Síntese do número de indivíduos incluídos no inquérito.

Caso referente	Localidade	Nº de indivíduos
2 e 3	Serra dos Órgãos - Garrafão, Guapimirim	14
4, 5 e 6	Monte Olivette, Guapimirim	24
7	Santana de Japuíba, Cachoeiras de Macacu	121
8, 11, 12 e 13	Cabeceira do Sana, Macaé	53
9	Macaé de Cima, Nova Friburgo	8
10	Serra dos Órgãos, Teresópolis	-
14	Sapucaia	-
TOTAL		220

Do total de entrevistados 57,3% eram do sexo masculino e 42,7% do sexo feminino (sendo uma gestante), com a idade variando entre sete e 87 anos, mediana de 42 anos. Em relação à cor, 63% se auto declararam brancos, 26% pardos, 7% negros, 3% índios e 1% amarelo.

Quanto à escolaridade, 4% dos entrevistados se auto declarou analfabeto e a maior parcela dos entrevistados relatou primeiro grau incompleto (37%).

O local de trabalho dos entrevistados foi dividido entre área rural ou urbana, sendo 57,8% e 36,4%, respectivamente. Noventa por cento das pessoas entrevistadas eram moradoras do local provável de infecção e os demais visitantes/turistas.

Na entrevista buscou-se história de deslocamento para áreas endêmicas de malária e história de exposição a áreas de mata. Entre os entrevistados 10% (n=22) confirmaram viagem anterior para área endêmica de malária em período superior a quatro anos, sendo dez destes indivíduos do grupo do Garrafão. Quando perguntados sobre viagem para Amazônia, 8,6% (n=19) tinham história de deslocamentos para essa região, sendo dez deles do grupo do Garrafão. Com relação às áreas endêmicas fora do Brasil, menos de 1% dos entrevistados relatou viagem para África e Ásia.

Oito entrevistados confirmaram viagem para área endêmica nos três meses anteriores à entrevista, sem relato de exposição significativa e malária no período. Cento e cinco indivíduos (48%) conheciam alguém que já haviam adquirido malária, e tinham algum conhecimento sobre a doença.

Quanto aos fatores de exposição individuais e ambientais, destacamos: 60% afirmaram ter bromélias na região próxima à moradia, 56% relataram a presença de macacos na região, 30% tinham o hábito de frequentar área de mata fechada; 29% moravam ou trabalhavam perto de madeireira.

Dos 220 indivíduos incluídos no estudo, 11 (5%) estavam sintomáticos no momento da entrevista (seis indivíduos de Santana de Japuiba, quatro de Cabeceira do Sana e um de Macaé de Cima). Foi considerado sintomático o indivíduo que apresentava febre acompanhada ou não de outros sintomas. Todos foram encaminhados ao Ambulatório de Doenças Febris Agudas para consulta médica e solicitação de exames laboratoriais para definição de diagnóstico. A pesquisa para malária (gota espessa, distensão sanguínea, teste rápido e PCR) foi realizada em três oportunidades distintas. Em todos os casos os testes laboratoriais foram negativos para malária e a sintomatologia apresentada foi atribuída à outras etiologias.

INQUÉRITO MOLECULAR – População exposta

Dos 220 indivíduos incluídos no estudo (população exposta), 219 foram incluídos no inquérito molecular. Nenhuma amostra foi considerada positiva para *Plasmodium* (gênero); ou *P. vivax* e/ou *P. malariae* pela técnica de PCR.

INQUÉRITO SOROLÓGICO – População exposta

Foi realizada a sorologia de 213 indivíduos. Nenhum apresentou sintomas e sinais sugestivos de malária nos 15 dias anteriores e por um período de seis meses após o diagnóstico do caso índice.

As prevalências obtidas através do teste de ELISA foram: cinquenta indivíduos (23,4%) tinham anticorpos anti-MSP-1₁₉. A tabela 4 apresenta as amostras testadas e a frequência de reatividade de acordo com a região estudada.

Tabela 4 – Amostras testadas e frequência dos soros humanos reativos a MSP-1₁₉.

Local	Nº Indivíduos	Amostras testadas	Amostras positivas	%
Garrafão, Guapimirim	14	14	01	7,1
Monte Olivette, Guapimirim	24	24	14	58
Santana de Japuiba, Cachoeiras de Macacu	121	115	05	4,3
Cabeceira do Sana, Macaé	53	52	26	50
Macaé de Cima, Nova Friburgo	08	08	04	50
TOTAL	220	213	50	23,4

Análise estatística

Foram encontradas diferenças significativas entre o percentual das amostras de Sana com anticorpos reagentes (50%) e os 4,3% das amostras reagentes de Cachoeiras de Macacu ($p=0,0000$).

Também observou-se diferenças significativas entre o percentual de amostras reagentes em Sana (50%) e o percentual encontrado em Garrafão (7,1%) ($p=0,003792$).

Não houve diferenças significativas entre o percentual de amostras reagentes em Sana (50%) e o percentual de amostras reagentes em Monte Olivetti ($p=0,4988$).

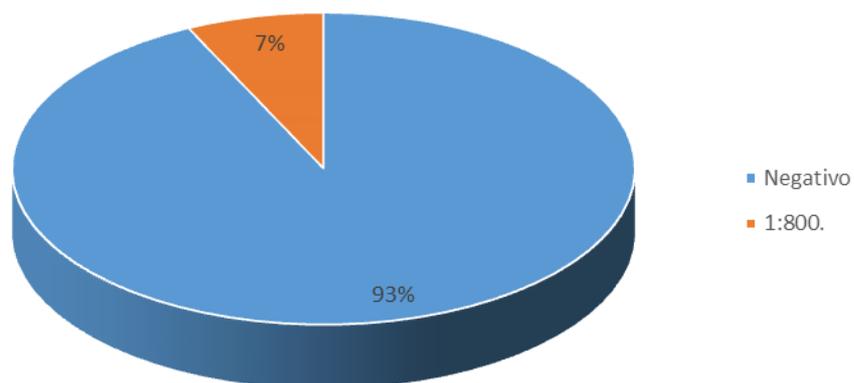
Houve diferença estatisticamente significativa entre o percentual das amostras de Monte Olivetti com anticorpos reagentes (58,3%) e os 4,3% das amostras reagentes de Cachoeiras de Macacu ($p=0,0000$). Também foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o percentual de amostras reagentes em Monte Olivetti (58,3%) com Garrafão (7,1%) ($p=0,001845$).

Considerações por região

Garrafão, Guapimirim

Todos os contactantes que entraram em área de mata com os casos 2 e 3 compareceram ao Ambulatório de DFA para realização de inquérito sorológico e molecular e coleta de informações epidemiológicas. As amostras foram coletadas 14 dias após o diagnóstico do primeiro caso na região. Apenas um indivíduo foi reativo para anticorpos anti-MSP1₁₉ (7,1 % dos testados) com titulação de 1:800. Esses dados podem ser visualizados no gráfico 3.

Gráfico 3 – Representação da frequência de amostras positivas na região do Garrafão e sua titulação



Monte Olivette, Guapimirim

As visitas no local para coleta de dados e amostras para realização de inquérito sorológico e molecular foram realizadas cerca de 20 meses após o diagnóstico do primeiro caso.

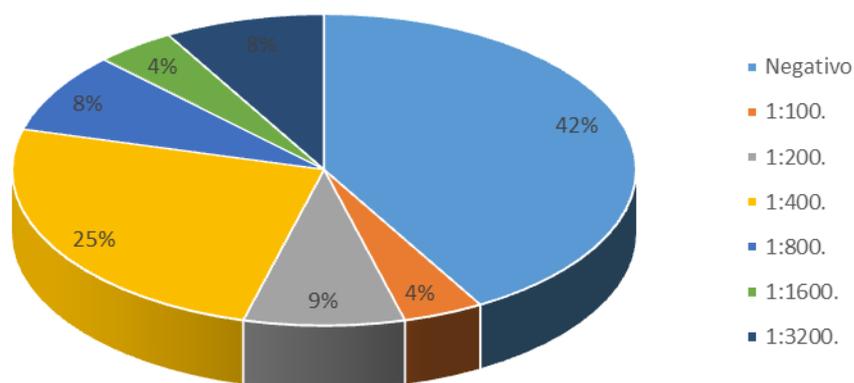
A reatividade para MSP1₁₉ encontrada na população estudada foi de 58%. Dos 14 indivíduos com amostras reativas para MSP1₁₉, dois deles já apresentavam resultado de sorologia positiva em 2010, como demonstrado em trabalho anterior (Miguel RB, 2011).

Dois caseiros da residência do caso 04 também apresentaram sorologia positiva (1:400 para ambos), bem como uma gestante moradora da casa vizinha a residência do caso 04.

Uma moradora do local, que residiu mais de 20 anos atrás em Belém, PA, teve amostra negativa na pesquisa de MSP1₁₉.

Todos os indivíduos com sorologia positiva eram moradores do condomínio, sem histórico de deslocamentos, viagem para área endêmica de malária, visita as demais localidades com casos, uso compartilhado de seringas, transplantes de órgãos ou hemotransfusões, ademais, nenhum apresentou sinais ou sintomas compatíveis com malária nos seis meses anteriores à coleta das amostras de sangue. O título mínimo encontrado foi de 1:100 e o máximo 1:3200. Esses dados podem ser visualizados no gráfico 4.

Gráfico 4 – Representação da frequência de amostras positivas na localidade de Monte Olivette e sua titulação



Santana de Japuiba, Cachoeiras de Macacu

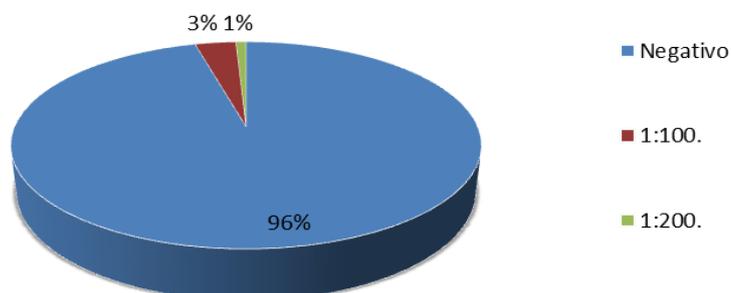
A primeira visita no local para coleta de dados e amostras para realização de inquérito sorológico e molecular foi realizada 22 dias após o diagnóstico do caso. As demais visitas foram agendadas em datas subsequentes.

A reatividade para MSP1₁₉ encontrada na população estudada foi de 4.3%. Os cinco indivíduos com amostras reativas identificados em Santana de Japuiba tinham como característica comum o deslocamento para outros estados nos meses anteriores à

coleta da amostra de sangue. Os estados referidos foram SC, ES, SP, BA, MG e MS, sem entrada em áreas de mata. Nenhum dos indivíduos com sorologia positiva apresentou sinais ou sintomas compatíveis com malária nos seis meses anteriores à coleta das amostras de sangue.

Alguns moradores recentes no local (cerca de seis meses), que já residiram em área endêmica de malária (Pará) e inclusive tiveram a doença no passado, e foram incriminados pela população local como os responsáveis pela transmissão de malária na região apresentaram sorologia negativa para MSP1₁₉. O título mínimo encontrado foi de 1:100 e o máximo 1:200. Esses dados podem ser visualizados no gráfico 5.

Gráfico 5 – Representação da frequência de amostras positivas na localidade de Santana e sua titulação



Cabeceira do Sana, Macaé

A primeira visita no local para coleta de dados e amostras para realização de inquérito sorológico e molecular foi realizada 55 dias após o diagnóstico do primeiro caso na região. As demais visitas foram agendadas em datas subsequentes.

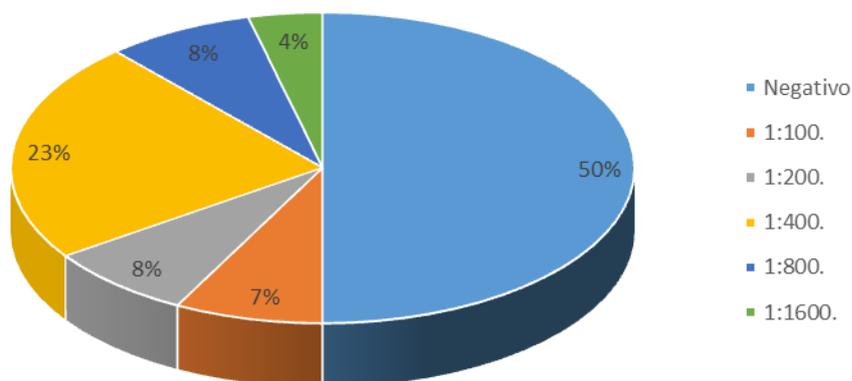
A reatividade para MSP1₁₉ encontrada na população estudada foi de 50%. Das amostras reativas a MSP1₁₉, chama atenção, entre os 27 indivíduos, três são os ex

moradores do local provável de infecção do caso 07, que residiram no local por vários anos até a venda da casa.

Os vizinhos mais próximos ao local provável de infecção do caso 07 também apresentaram sorologia positiva, trata-se do sogro e marido da paciente 11, que teve malária 21 meses após o primeiro caso na localidade (caso 07); (1:400 e 1:800 respectivamente). A coleta de sangue destes indivíduos ocorreu 55 dias após o diagnóstico do caso 07. Uma mulher, também residente muito próximo ao local de infecção do caso 07, relatou que no passado teve sintomas muito semelhantes à malária, que evoluíram para cura sem tratamento, também apresentou sorologia positiva para MSP1₁₉ (1:200).

Em todas as diferentes ocasiões de coleta e nas diferentes áreas houve amostras reativas para MSP1₁₉. Nenhum dos indivíduos com sorologia positiva apresentou sinais ou sintomas compatíveis com malária nos seis meses anteriores à coleta das amostras de sangue. O título mínimo encontrado foi de 1:100 e o máximo 1:1600. O gráfico 6 apresenta as amostras positivas e negativas da região.

Gráfico 6 – Representação da frequência de amostras positivas na localidade de Cabeceira do Sana e sua titulação



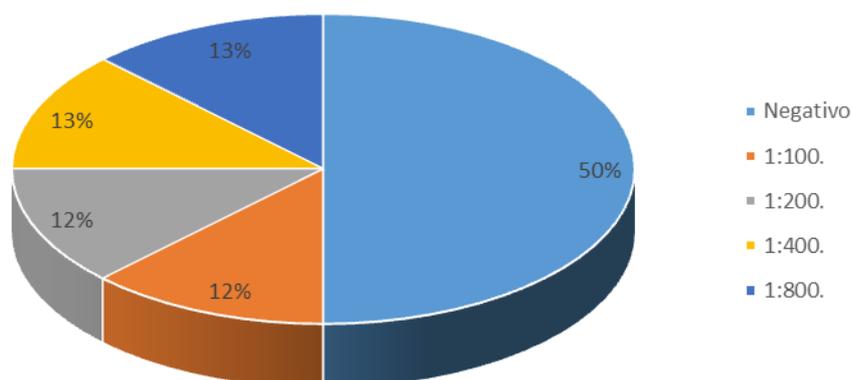
Macaé de Cima, Nova Friburgo

A primeira visita no local para coleta de dados e amostras para realização de inquérito sorológico e molecular foi realizada 70 dias após o diagnóstico do caso. As demais visitas foram agendadas em datas subsequentes.

A reatividade para MSP1₁₉ encontrada na população estudada foi de 50%. Dos quatro indivíduos com amostras reativas para MSP1₁₉, dois são caseiros da casa identificada como local provável de infecção do caso, e trabalham no local há vários anos, os outros dois são residentes na casa vizinha.

Nenhum dos indivíduos com sorologia positiva apresentou sinais ou sintomas compatíveis com malária nos seis meses anteriores à coleta das amostras de sangue. O título mínimo encontrado foi de 1:100 e o máximo 1:800. O gráfico 7 apresenta as amostras positivas e negativas da região.

Gráfico 7 – Representação da frequência de amostras positivas na localidade de Macaé de Cima e sua titulação



PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DE VETORES

As coletas entomológicas foram realizadas em quatro localidades situadas em áreas próximas a Mata Atlântica no Estado de do Rio de Janeiro, cuja vegetação é rica em bromélias, que funcionam como criadouros de formas imaturas de anofelinos do subgênero *Kerteszia*.

Somando todas as regiões investigadas, foram coletados no total 326 anofelinos conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5 – Número de anofelinos coletados por localidade pesquisada.

Localidade	Nº de anofelinos coletados
Guapimirim (Condomínio Monte Olivette)	08
Cachoeiras de Macacu (Santana de Japuiba)	18
Nova Friburgo (Macaé de Cima)	31
Macaé (Cabeceira do Sana)	269
TOTAL capturado	326

Guapimirim

A captura de mosquitos adultos no município Guapimirim ocorreu no Condomínio Monte Olivette no período de janeiro a junho de 2012. Foram realizadas de uma a duas coletas a cada mês no período das 17:00 às 22:00h, muito próximo à mata fechada, utilizando-se armadilha Shannon, luz e isca animal (cavalo). Foram capturados sete

Anopheles (Kerteszia) cruzii (Dyar & Knab, 1908), e um *Anopheles (Myzorhynchella) parvus* (Chagas, 1907), totalizando oito anofelinos capturados.

Cachoeiras de Macacu

A captura de mosquitos no município Cachoeiras de Macacu ocorreu no Condomínio Santa Helena, em Santana de Japuíba, em setembro de 2011 no período das 17:00 e 21:00h. Como o local provável de infecção do caso não era tão próximo à mata fechada, as coletas foram realizadas no peridomicílio. Foram capturados 11 *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* (Curry, 1932), cinco *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Lynch-Arribáizaga, 1878) e dois *Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922), totalizando 18 anofelinos.

Nova Friburgo

A captura de mosquitos no município de Nova Friburgo ocorreu em Macaé de Cima em uma única coleta no período das 17:00 e 21:00h. A coleta ocorreu nas proximidades da casa considerada como local provável de infecção (peridomicílio) e na região de mata fechada próxima ao domicílio, 1004m de altitude.

Foram capturados 30 *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, provenientes de coletas de imaturos e um *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* (Peryassú, 1922) em isca animal (cavalo), totalizando 31 anofelinos.

Macaé

A investigação da fauna de mosquitos no município de Macaé (região do Arraial do Sana e Cabeceira do Sana) ocorreu no período de novembro de 2011 a abril de 2013 utilizando-se armadilha Shannon, luz e isca animal (cavalos). Foram escolhidas duas áreas para coletas de adultos e formas imaturas desses culicídeos, identificadas como *Ponto 1*, local provável de infecção do caso 7, área de mata fechada com 735m de altitude e *Ponto 2*, local de permanência do caso 7, área que recebe muitos visitantes

caracterizada como peridomicílio, com 380m de altitude; e onde a equipe de entomologia que realizou as capturas ficou hospedada.

Foram realizadas 41 coletas de adultos no Ponto 01, durante 15 meses, com um total de 247 anofelinos, dos quais 239 da espécie *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, um *Anopheles lutzi*, cinco *Anopheles (Nyssorhynchus) parvus*, três *Anopheles (Nyssorhynchus) argyritarsis* (Robineau-Desvoidy, 1827) um *Anopheles (Nyssorhynchus) galvaoi* (Causey, Deane & Deane, 1943).

No Ponto 02, foram realizadas 20 coletas por sete meses com um total de 22 anofelinos, discriminados como se segue: seis *Anopheles (Nyssorhynchus) parvus*, 10 *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* (Gabaldon, Cova Garcia & Lopez, 1940); dois *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* (Root, 1926); um *Anopheles (Nyssorhynchus) argyritarsis*, quatro *Anopheles (Nyssorhynchus) evansae* (Brethes, 1926); um *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* (Gabaldon, Cova Garcia & Lopez, 1941).

O gráfico 8 e tabela 6 apresentam a frequência de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* coletados mês a mês na localidade do Sana, Macaé.

Gráfico 8 - Frequência de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* coletados mês a mês na localidade do Sana, Macaé.

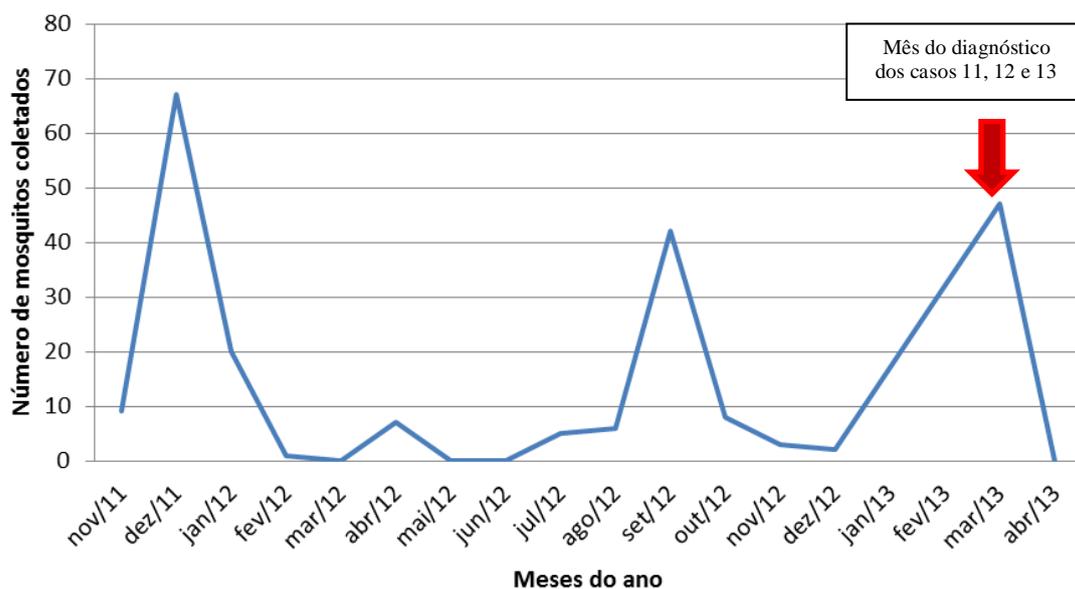


Tabela 6 – Mês de coleta, número de horas de captura e número de *An. cruzii* capturados.

Meses	<i>An. cruzii</i>	Horas de captura
nov/11	9	7
dez/11	67	3
jan/12	20	9
fev/12	1	18
mar/12	0	12
abr/12	7	9
mai/12	0	18
jun/12	0	4
jul/12	5	6
ago/12	6	6
set/12	42	4
out/12	8	2
nov/12	3	3
dez/12	2	3
jan/13	17	5
fev/13	Não houve coleta	
mar/13	47	3
Abr/13	0	6
Total	234	84

Análise molecular

A análise molecular da glândula salivar dos vetores capturados não identificou nenhum mosquito com plasmódio.

ESTUDO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS

Investigação em animais mantidos no CPRJ

Foram examinados 30 primatas mantidos no CPRJ; e a coleta das amostras foi realizada em novembro de 2011. Dezoito animais eram do sexo feminino (62%); a média de idade foi seis anos, mediana de sete anos [1-14]. O peso médio 2,800g [700g – 7,500g]. Nenhum animal examinado era esplenectomizado.

Acompanhamento dos primatas

Todos os animais encontravam-se em bom estado geral até o final do estudo, com exceção de um *Saimiri*, de origem amazônica, procedente de Cachoeiras de Macacu doado ao CPRJ pesando 1110g, que apresentou uma síndrome diarréica associada à febre baixa e evoluiu para óbito no final de setembro de 2013. Este animal não apresentava indícios clínicos ou moleculares para infecção por *Plasmodium* nos exames realizados 22 meses antes do óbito. Foi realizada autópsia e coletado material de cérebro, pulmão, fígado, e baço para análise histopatológica e PCR para malária. Fragmentos de baço e fígado foram submetidos à extração de DNA. A pesquisa de plasmódio através de exame molecular foi negativa.

Investigação em animais de vida livre

A investigação do óbito de um primata de vida livre também foi realizada, após o comunicado do Dr. Alcides Pissinati, chefe do CPRJ.

A carcaça do animal, de vida livre, foi encontrada nos arredores do CPRJ em dezembro de 2013. Tratava-se de uma fêmea, *Alouatta clamitans*, com aproximadamente 15 anos, com sinais de decomposição e perna direita com larvas (bicheiras) na região do calcanhar. O animal passou por autópsia e fragmentos de baço e fígado foram submetidos à extração de DNA. A pesquisa de plasmódio através de exame molecular na amostra do baço foi positiva para *P.simum/P.vivax*.

A caracterização molecular através da análise de fragmentos da amostra está descrita no quadro 8 o animal foi identificado com MB.

Uma família de seis primatas, do gênero *Alouatta*, da família *Atelidae*, popularmente conhecidos por bugio, guariba ou barbado, inicialmente de vida livre, apreendidos pelo IBAMA nos arredores da cidade de Angra dos Reis e mantidos no Criadouro Passaredo, em Guaratiba, teve suas amostras coletadas em novembro de 2013. A família era composta de *Pai* e *Mãe* e quatro filhos, sendo dois machos e duas fêmeas com peso variando de 3,800 a 5,350kg. Após a coleta de sangue, a primeira filhote fêmea veio a óbito, sem investigação da causa. O exame molecular de todos os animais foi negativo.

Inquérito Molecular

O exame molecular (PCR) detectou nove indivíduos (30%) infectados por *Plasmodium*. Cinco infectados por *P.malariae/P.brasilianum* (56%), três por *P. vivax/P.simium* (33%) e um (11%) por *P.malariae/P.brasilianum* e *P. vivax/P.simium* (infecção mista). O quadro 9 apresenta os primatas infectados, a espécie plasmodial infectante e a procedência dos mesmos.

Quadro 9 – Espécie plasmodial e procedência dos primatas com exame molecular positivo para plasmódio.

Identificação	Primata	Espécie plasmodial encontrada
2539	<i>Cebus xanthosternos</i>	<i>P.malariae/P.brasilianum</i>
2005	<i>Cebus xanthosternos</i>	<i>P.malariae/P.brasilianum</i>
2324	<i>Cebus xanthosternos</i>	<i>P. vivax/P.simium</i>
2503	<i>Cebus sp</i>	<i>P. vivax/P.simium</i>
2559	<i>Cebus sp</i>	<i>P. vivax/P.simium</i>

2209	<i>Cebus robustus</i>	<i>P. vivax/P. simium e</i> <i>P. malariae/P. brasilianum</i>
2203	<i>Aotus nigriceps</i>	<i>P. malariae/P. brasilianum</i>
2443	<i>Alouatta g. clamitans</i>	<i>P. malariae/P. brasilianum</i>

A caracterização molecular através de análise de fragmentos do DNA do *Plasmodium* foi realizada para todos os primatas com PCR positiva para *P. vivax*. Assim como para os humanos, microssatélites de 10 loci (MS1, MS5, MS6, MS7) e dois blocos polimórficos da MSP-1 (b102 e b110) foram buscados. O quadro 10 apresenta os resultados.

Quadro 10 - Caracterização molecular das amostras de primatas a partir da análise de fragmentos.

Amostra	MARCADOR					
	MS1	MS5	MS6	MS7	MSP1b12	MSP1b110
2324	287*	200	209	349	397**	224
2503	287*	182**	194	322*	154	224
2209	287*	200	209	367	364	224
2559	287*	200	209	349	364	429
MB	236*	182**	200	355	397**	372

*Alelo novo, nunca detectado anteriormente em humanos e/ou primatas.

** Alelos identificados em primatas não humanos em estudo conduzido no município de Indaial, Santa Catarina.

Alelos já descritos em amostras humanas

Alelos comuns a humanos e primatas, identificados até o momento, apenas neste estudo.

X Alelo que não funcionou

Inquérito Sorológico dos primatas

As 30 amostras de primatas mantidos no CPRJ analisadas apresentaram, baixa imunoreatividade a MSP1₁₉. Não foi possível identificar um ponto de corte (*cut off*) devido a falta de controles negativos (amostras de macacos não expostos à transmissão de malária).

DISCUSSÃO

Aspectos históricos

De acordo com Carvalho & Rachou 1950, no início do século XX, a malária era endêmica no estado do Rio de Janeiro e praticamente restrita à baixada fluminense, área então coberta por grandes mangues, espaços propícios para a reprodução do principal vetor da malária, o *An. darlingi* presente na área. Também eram encontrados infectados *An. aquasalis*, *An. Albitarsis* e *An. bellator*. A espécie de plasmódio predominante detectada na época era o *P. vivax* (Arquivos Fundação Rockefeller, 1928 APUD Miguel 2011).

Até 1945, diversos municípios do estado do Rio de Janeiro apresentavam casos autóctones de malária: Angra dos Reis, Araruama, Barra do Piraí, Barra Mansa, Bom Jesus de Itabapoana, Cabo Frio, Cachoeiras de Macacu, Campo dos Goytacazes, Casemiro de Abreu, Duque de Caxias, Itaboraí, Itaguaí, Itaverá, Macaé, Magé, Mangaratiba, Maricá, Nilópolis, Niterói, Nova Iguaçu, Parati, Piraí, Rio Bonito, Resende, Santa Maria Madalena, São Fidélis, Saquarema, Silva Jardim e Vassouras (Carvalho & Rachou 1945). Esses autores descrevem que, em alguns municípios, a malária era endêmica em toda sua extensão e, em outros, a doença estava localizada apenas em algumas regiões, corroborando com o descrito por Barros Barreto (1940), que também chamou a atenção para a ocorrência dos casos principalmente no verão, como no presente estudo.

Diversas ações foram implementadas no Estado do Rio de Janeiro com o objetivo de combater a malária, dentre as quais a *quininização* forçada (Benchimol e Silva, 2008). A partir das décadas de 1960 e 1970, com o sucesso da campanha de erradicação da malária na região extra-amazônica, a malária foi considerada eliminada

no estado que se transformou em área de transmissão interrompida (Moraes, 1990), entretanto, sem eliminação completa do mosquito transmissor (Centro de Estudos e Pesquisa em Antropozoonoses do estado do Rio de Janeiro, exposto no I Encontro macrorregional de malária do Rio de Janeiro em 2009).

São escassos os dados disponíveis sobre casos autóctones nos anos seguintes, e os casos identificados principalmente nas cidades do interior do estado eram importados de áreas endêmicas, e outros secundários introduzidos.

Aspectos epidemiológicos (dinâmica de transmissão – tempo, local, pessoa, resposta imune)

O ambulatório de referência para Doenças Febris Agudas (DFA) do IPEC atende em média 200 casos suspeitos de malária por ano, e recebe encaminhamento de diversas outras unidades de saúde do estado. No período deste estudo, o DFA foi responsável pelo atendimento de cerca de 40% de todos os casos autóctones diagnosticados no estado, e pela investigação e identificação dos casos em Macaé, Guapimirim, Cachoeiras de Macacu, Teresópolis e Sapucaia. A maioria dos casos apresentados neste estudo procurou outra unidade de saúde antes de ser atendido no DFA-IPEC. É provável que a assistência especializada faça diferença no diagnóstico clínico de doenças menos prevalentes na cidade do Rio de Janeiro, como a malária, que raramente é considerada como diagnóstico diferencial de febre aguda (Bressan 2010), somado à ocorrência de casos autóctones, que também dificulta a suspeição diagnóstica.

As áreas apontadas através do georeferenciamento mostram atualmente a possibilidade de um corredor de infecção no estado do RJ, com dois aglomerados, provavelmente distintos: perfil 1 que engloba dois focos - *Guapimirim/Teresópolis* e *Lumiar/Sana*. O foco *Guapimirim/Teresópolis* contempla os casos ocorridos na base da

montanha do Dedo de Deus, na Serra dos Órgãos (Garrafão, Monte Olivette e Teresópolis) e o foco *Lumiar/Sana* que contempla os casos adquiridos na região da Serra do Mar, em Lumiar, Macaé de Cima, Arraial do Sana, Cabeceira do Sana. Os casos ocorridos em Cachoeiras de Macacu e Sapucaia estão fora do corredor considerado aparentemente vulnerável à transmissão da malária, identificados como perfil 2 neste estudo e discutidos a seguir.

Dinâmica de transmissão

Os resultados aqui apresentados estão em conformidade com a hipótese de Curado et al 2006 e Duarte et al 2008, que sugerem que em áreas de Mata Atlântica, os seres humanos podem ser infectados com *Plasmodium* spp quando adentram em áreas de mata fechada onde existem primatas e vetores como *An cruzii*.

A falta de relatos de casos anteriores nessas regiões (com exceção da localidade de Lumiar) poderia ser atribuída à baixa incidência de malária na área, à dificuldade de diagnóstico e à subnotificação.

Observou-se que os casos não ocorreram em áreas consideradas urbanas, mas em locais em que a mata original cedeu seu espaço ao ambiente modificado. Nas visitas aos locais de infecção comprovou-se a sua baixa densidade demográfica, de acordo com a teoria de Garcia (2010) de que a malária é uma doença essencialmente rural. Segundo a OMS (2007), focos de malária raramente são isolados e seus limites territoriais na maioria das vezes não são bem definidos, já que são dependentes do vetor e de hospedeiros (humanos ou não). A distância entre as localidades deste estudo por estrada é grande (> 100km), mas o cálculo em linha reta entre os pontos demonstrou que a distância média foi de 45 km (mediana 44 km), a distância mínima entre os diferentes focos 24.3 km e a distância máxima 79.7 km.

Ao se supor primatas não humanos como reservatórios do plasmódio nas regiões com casos, os relatos na literatura apontam como seu o deslocamento sendo muito variável e relacionado a vários fatores como: características ambientais, distribuição dos recursos alimentares no tempo e no espaço, tamanho e densidade dos grupos, grau de territorialidade da espécie e presença de competidores, (para detalhes rever Porfírio de Souza 2005). De forma geral, o registro da área percorrida para suas atividades para primatas do gênero *Alouatta*, denominados popularmente bugios, guaribas, barbados ou carajás e descritos por diversos autores como reservatórios de plasmódio (Araújo et al 2013, Yamasaki 2011, Deane 1992), varia entre <2 a 182 hectares (Porfírio de Souza 2005), cerca de dois quilômetros. Contudo, são animais de comportamento, geralmente, discreto com movimentos lentos (Porfírio de Souza 2005), (Hirsch et al 1991 APUD Oliveira 2011). Já os primatas do gênero *Cebus*, tem o deslocamento relacionado ao tamanho e qualidade da área, à disponibilidade e distribuição espacial de recursos alimentares, à preferência de *habitats* e à densidade populacional da espécie (para detalhes, rever Pereira Martins 2010). Diferentes valores de área de uso foram registrados para as espécies de *Cebus* com variações entre 80 ha a 969 ha (Pereira Martins 2010), cerca de 90 metros a nove quilômetros.

Segundo relatos da veterinária do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, localizado na Serra do Mar na Região Serrana do Rio de Janeiro englobando os municípios de Teresópolis, Petrópolis, Magé e Guapimirim, a presença de primatas de vida livre na Floresta Atlântica do parque é constantemente observada nas imagens de máquinas fotográficas instaladas em distintos locais do parque. A presença de diversos primatas já foi comprovada na região, inclusive com o achado de um filhote de *Alouatta* pela população do Monte Olivette. Em todas as regiões do estudo, com exceção de Cachoeiras de Macacu e Sapucaia, a população local apontou a presença de primatas

não humanos na região. Segundo relatos, os mesmos tinham tamanho de uma criança em fase pré-escolar e seus ruídos sonoros audíveis mesmo em longas distâncias. Este relato é compatível com a descrição de representantes do gênero *Alouatta*, apontados como a segunda maior espécie de primata sul-americano, medindo entre 60 a 65 centímetros, e pesando de 6 a 10 kg, e caracterizados pela utilização de todos os níveis da floresta e mais frequentemente o estrato superior, embora possam descer ao chão (Neville et al 1988 APUD Oliveira 2011). São encontrados em altitudes de 0 a 3.200 m. Os machos de *Alouatta* vocalizam e essa vocalização parece associada ao contexto da territorialidade, podendo ser interpretada com a função de defesa de espaço, sendo emitida principalmente nas periferias de áreas relativamente delimitadas e na direção dos grupos vizinhos; usualmente para determinar a localização da tropa e defender seu território (Porfírio de Souza 2005, Oliveira 2011).

Os resultados deste estudo apontam para predomínio do *An cruzii* como vetor preferencial nas áreas de montanhas onde há abundantes bromélias, criadouros de anofelinos do gênero *Kerteszia*, que picam na copa das árvores e no solo (Deane 1992) e apresentam a alta mobilidade vertical (Rona et al 2009). *An cruzii* é considerado o vetor da malária na Mata Atlântica, e utiliza as bromélias como seu habitat larval (Lorenz et al 2012). A presença de bromélias e a construção de moradias muito próximas à mata, em algumas situações no mesmo nível da copa de algumas árvores, pelo relevo da região, facilitam a proximidade de humanos com o *An cruzii* nesses locais. Como no nosso estudo, *An cruzii* também foi a espécie predominante em capturas realizadas em áreas com malária autóctone no estado de São Paulo (Neves et al 2013, Duarte et al 2013), e é considerado vetor de plasmódios simianos e humanos (Marrelli et al 2007).

Os casos aqui apresentados ocorreram em sua maioria em visitantes (71.5%). A baixa frequência de exposição aos anofelinos presentes na região e, ao parasito, e a

consequentemente reduzida proteção imune (premunição) do visitante contra o plasmódio e resistência adquirida contra a doença, seriam possíveis explicações para a maior ocorrência de casos nesses indivíduos quando comparados aos moradores, *a priori*, constantemente expostos ao plasmódio, como também sugere Curado et al (1997) ao observar os casos autóctones de Mata Atlântica de SP.

A hipótese de dois focos autóctones nas regiões descritas no estado é justificada pela frequência elevada de sorologia positiva entre os moradores de áreas próximas onde ocorreram os casos, (Monte Olivette 58%; Sana 50%; e Macaé de Cima 50%). A única localidade com frequência de sorologia positiva baixa foi Garrafão, no grupo que entrou na região de mata (7,1%). A baixa frequência encontrada nesse grupo também registrada no estudo de Miguel, 3,8%, (2011) pode ser explicada pela precocidade com que foi realizada a pesquisa, 14 dias após o diagnóstico dos casos, tempo curto para a detecção de resposta anticorpo.

Ao considerar o conjunto de indivíduos incluídos no estudo nas regiões em que os dois focos foram descritos (*Sana/Lumiar* e *Guapimirim/Teresópolis*), a frequência de sorologia positiva para IgG MSP1₁₉ foi 46%, semelhante a outro estudo realizado no Vale do Ribeira, região de Mata Atlântica com transmissão persistente no estado de São Paulo, que encontrou prevalência de 49% e 32% para anticorpos de formas assexuadas de *P. vivax* e *P. malariae* respectivamente (Curado et al 2006).

Os casos de malária autóctone na região da Serra dos Órgãos (Garrafão e Monte Olivette, bairros vizinhos), foram descritos primeiramente por nosso grupo (Costa et al, 2010) e ocorreram em forma de conglomerados em 2008, 2009 e 2010. Acrescenta-se a esta região, o caso adquirido no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Teresópolis) em 2013, todos na base do Dedo de Deus, área de Mata Atlântica fechada e parcialmente preservada, com os locais em que os casos foram adquiridos, variando entre altitudes de

340-1300 metros, altitudes aceitáveis para a transmissão da malária, segundo a maioria dos autores (OMS 2007) e a distância total entre os casos foi de 6,54 km².

Como as áreas mencionadas estão localizadas em regiões de serra, a altitude faz com que a temperatura seja mais agradável no verão e bastante fria no inverno. Nesse estudo *An. cruzii* foi um mosquito abundante nas áreas com altitude elevada, da mesma forma como identificado na Serra da Bocaina, fronteira entre os estados do RJ e SP (Marrelli et al 2007).

A temperatura é um fator ambiental importante para a dinâmica de transmissão da malária (OMS, 2007), já que a multiplicação do plasmódio no interior do vetor é reduzida drasticamente entre 20° a 27°C e, segundo alguns autores, o desenvolvimento parasitário cessa abaixo de 16°C (OMS, 1961, Garcia 2010). Barros Barreto (1940) e Garcia (2010) afirmam que para um ótimo desenvolvimento de *P.vivax*, espécie identificada em todos os casos deste estudo, a temperatura ideal seria entre 22°C e 24°C. A maioria dos casos aqui apresentados ocorreu nos meses mais quentes do ano, em que a temperatura se mantém acima dos 20°C, em conformidade com o relatado por Cerutti (2007) no Espírito Santo. Miguel 2011 aponta que a maioria dos casos de malária notificados no estado do RJ ocorreram no primeiro semestre. Entretanto, como salienta Garcia (2010), a temperatura não pode ser considerada como determinante único, uma vez que as atividades humanas e seu impacto na ecologia local geralmente têm sido muito mais significativos. Vittor et al (2006), mostraram que o desmatamento aumentou a taxa de contato entre anofelinos e seres humanos na Amazônia peruana, aumentando assim a incidência da malária na região. Esta poderia ser a explicação do surgimento recente de casos nessas regiões, sem histórico anterior de malária, já que o desmatamento para a construção de moradias vem ocorrendo de forma crescente nesses locais onde as modificações produzidas pelo homem são capazes de criar condições

ecológicas e climáticas que favorecem algumas espécies de vetores (Castro et al 2006, Olson et al 2010).

A espécie visualizada no exame direto de todos os casos de malária adquirida na região da Serra dos Órgãos foi *P.vivax*, confirmada por exame molecular em três dos seis casos. Em relação aos aspectos sorológicos, a variante VK 210 (*P.vivax* clássico) predominou e foi observada em quatro dos cinco casos pesquisados; classicamente, esta é a variante de CSP mais descrita em todo mundo (Machado & Póvoa 2000, González et al 2001, Lim et al 2005, Souza-Neiras et al 2007). Apenas um caso reagiu a variante *P.vivax*-like e um caso não reagiu a nenhum peptídeo de *P.vivax* (MSP1-19 e variantes de CSP) nem a antígeno bruto por IFI. Anticorpos para *P. falciparum* (CSP, MSP3 e GLURP) foram observados em dois casos. No estudo conduzido por Cerutti et al (2007), a variante VK 210 (*P.vivax* clássico) também predominou.

O primeiro caso relatado na região do Sana ocorreu de forma isolada, em maio de 2011 e foi identificado e descrito por nosso grupo (Brasil et al 2013) e os três seguintes ocorreram, em formato de aglomerado, 21 meses depois do primeiro caso (meses de fevereiro e março de 2013). A investigação na localidade já acontecia quando os três casos seguintes ocorreram e as amostras de indivíduos da população vizinha já haviam sido coletadas, inclusive, de familiares dos casos. Na Cabeceira do Sana onde foram identificados os casos de malária, as altitudes variam de 300 a 1.400m, a mata é fechada e repleta de bromélias e a circulação de humanos é muito restrita. A distância mínima entre os casos foi de 0,82 km e a máxima de 7,40 km, o que aponta para uma transmissão localizada, na qual a introdução é pouco provável, já que o primeiro caso descrito na região ocorreu em um homem que permaneceu praticamente isolado durante mais de duas semanas em mata fechada. Em todos os casos, em que se identificou plasmódio no exame direto, a espécie visualizada foi *P. vivax*, e o exame molecular

mostrou infecção por *P. vivax* em três casos e em um caso infecção mista - *P. vivax* e *P. falciparum*. Em relação aos aspectos sorológicos, três dos quatro casos foram investigados, e todos responderam a todos os antígenos pesquisados (Elisa MSP1₁₉, de antígeno bruto para *P. vivax*, todas as variantes de CSP de *P. vivax*, CSP de *P. malariae* e *P. falciparum*). A paciente nº 12, identificada no exame molecular com infecção mista, apresentou anticorpos também para MSP3 e GLURP de *P. falciparum*. A presença de *P. falciparum* na região de Mata Atlântica já foi observada em indivíduos assintomáticos no estudo conduzido por Cerutti et al (2007) na região montanhosa do estado do ES, e por Curado et al (2006), que descreveu quatro indivíduos com PCR positiva para *P. falciparum* e *P. vivax* (infecção mista) e dois indivíduos com PCR positiva para *P. falciparum*. Destes, quatro eram oligossintomáticos e dois (um com infecção mista e outro com infecção por *P. falciparum*) eram assintomáticos. Miguel (2011) em inquérito molecular no município de Guapimirim também encontrou um indivíduo assintomático com PCR positivo para *P. falciparum* e exame direto negativo.

Estes são os primeiros casos de malária nestas regiões (Sana e Guapimirim), consideradas essencialmente turísticas no estado do RJ e com todo o exposto, pode-se afirmar que não se trata de reintrodução da doença nestas regiões, mas sim, de casos autóctones em localidades novas em que nunca foram descritos casos no passado. A transmissão para os humanos seria acidental, quando os mesmos adentram o *habitat* tanto do vetor, quanto de um provável reservatório não humano. Observou-se que a construção de moradias cada vez mais próximas à mata e o desmatamento na região, associado à entrada constante na mata, sugerem relação com a aquisição da malária. A frequência de 50% dos indivíduos da vizinhança dos casos com sorologia positiva (IgG anti-PvMSP1₁₉) é um indicativo que aponta para circulação de plasmódio na região. A malária, portanto, nestas regiões seria uma zoonose e não antroponose como ocorre em

regiões endêmicas, assim como o já sugerido em estudos realizados em outras regiões montanhosas nos estados do ES e SP (Cerutti et al 2007a, Marelli et al, 2007, Ueno et al 2007, Yamasaki T, 2011).

Em relação ao município de Nova Friburgo, desde a década de 1990, começaram a ocorrer casos autóctones de forma localizada e frequente nas localidades de Lumiar e São Pedro da Serra, importantes roteiros turísticos separados apenas por cinco quilômetros e inseridos na região serrana do estado. A região de Nova Friburgo, (principalmente os distritos citados) foi a que apresentou maior número de casos no estado no período estudado (n=14), correspondendo a 37% do total de casos autóctones notificados, entretanto, apenas um destes casos foi incluído neste estudo, já que uma equipe local já diagnostica e trata os casos da região e a comunicação destes é realizada diretamente para a Secretaria Estadual de Saúde (SESDC, RJ). Não foi possível caracterizar morfológicamente a única amostra proveniente desta região e não foi realizado inquérito sorológico na área. Contudo, Azevedo (1997), ao estudar amostras sanguíneas coletadas nesta região em 1993, durante o primeiro cluster de casos no local (35 amostras) e em 1996 (65 amostras) observou uma prevalência de 35,4% e 47,8% de IgG-anti *P. vivax* positiva, respectivamente. *An cruzii* foi identificado como vetor na região e foi encontrado em 98% das capturas, com densidade vetorial mais intensa na primavera. Estes resultados demonstram que a circulação de plasmódio já ocorre na região há pelo menos duas décadas desde o primeiro relato de casos em 1993, evidenciada pelas reações sorológicas na população contactante no mesmo ano e em 1996; e pelos casos notificados nos anos de 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2010, 2012 e 2013.

Algumas hipóteses são levantadas para explicar a localização de casos nesta região. A área é receptiva e casos importados são capazes de gerar casos introduzidos. A

presença de um templo da comunidade religiosa Santo Daime (Oliveira DM, 2010), associada ao frequente deslocamento de seus fiéis para a região norte do país, poderia ser uma explicação para a ocorrência de casos na localidade, já que estes indivíduos retornariam da área endêmica com infecção por plasmódio, e a presença de vetores na região subsidiaria a presença de casos secundários introduzidos. Outra hipótese que justificaria a ocorrência de casos seria a presença de madeiras na região que são abastecidas com produtos oriundos da região norte do país; vetores infectados poderiam ser transportados até a região, de forma similar à já bem descrita “*malária de aeroporto*”. A hipótese de um reservatório não humano que serviria como fonte contínua de infecção também não pode ser descartada, o que está em consonância com a hipótese levantada para os casos observados no Sana e na Serra dos Órgãos.

Os estados de SP e ES apresentam casos autóctones constantes, identificados, em sua maioria como *malária vivax* (Branquinho et al, 1997). A frequência de casos é bem superior ao número notificado no estado do Rio de Janeiro; comparando períodos iguais (2006-2013), o estado do ES notificou quase nove vezes mais casos autóctones que o RJ (324 x 38 casos), bem como os estados de SP (183) com quase cinco vezes o número de casos do RJ, apesar de condições climáticas e epidemiológicas semelhantes. O estado de Minas Gerais é o que menos notifica casos autóctones na região Sudeste, não ocorrendo registro de transmissão da *malária* no estado desde 2008 (Mota 2013). O perfil epidemiológico do estado de SP, com duas áreas e vetores distintos (serra e planalto, subgênero *Kertessia* e subgênero *Nyssorhynchus* respectivamente) é muito semelhante ao descrito neste estudo, em que casos autóctones e casos introduzidos têm perfis diferentes.

Em relação ao perfil epidemiológico 2 – possibilidade de casos secundários introduzidos a partir de caso índice importado na região de Cachoeiras de Macacu, que como descrito anteriormente, já foi área endêmica de malária no passado.

Um fator que indica que o caso nessa localidade não é autóctone e sim introduzido é a baixa prevalência de anticorpos na população contactante, moradora do mesmo condomínio, somado a captura entomológica exclusiva de vetores do subgênero *Nyssorhynchus* (*An aquasalis*, *An albitarsis* e *An triannulatus*), diferente do encontrado nas outras regiões pesquisadas. De acordo com Laporta et al 2011, espécies do subgênero *Nyssorhynchus* também podem participar da dinâmica da transmissão da malária em áreas fora da Amazônia; *An albitarsis* poderia estar envolvido na dinâmica da transmissão da malária em algumas áreas de Mata Atlântica, contudo, é necessário uma considerável densidade vetorial para que isto ocorra, o que não foi observado em nosso estudo. Além disso, o local provável de infecção do caso, um condomínio em uma área sem matas ao redor, sugere a possibilidade que este tenha sido um caso secundário introduzido, já que nesta região a presença de mata é escassa. Foram analisadas amostras de praticamente todos os indivíduos que atualmente residem no condomínio, além de outros moradores da região próxima e que apresentavam história prévia de deslocamento para área endêmica, sem qualquer resultado positivo no inquérito sorológico realizado. Uma grande obra realizada na região, para a construção do Complexo Petroquímico do Rio de Janeiro (COMPERJ), impõe à região um fluxo constante de indivíduos oriundos de diversas regiões do país e do exterior. Portanto, analisando o contexto epidemiológico; os fatores envolvidos na dinâmica de transmissão; a baixa frequência de anticorpos encontrada na população local; a identificação de anticorpos contra MSP1-19 e *P.vivax* clássico (VK 210) CSP de *P. falciparum* e MSP3 e GLURP de *P. falciparum* no soro do paciente; a ausência de

vetores do subgênero *Kertessia* capturados; a alta parasitemia do caso (5,880 p/mm³), quando comparada as demais incluídas no estudo; e a evolução clínica complicada do paciente com necessidade de internação hospitalar, a hipótese de infecção secundária à introdução, parece ser a mais provável. A ocorrência pouco usual de malária (um caso em 1996, oito casos no período de 2002 a 2010, seis em 2003 e dois em 2004- SINAN-RJ) não contribui em nada para o esclarecimento do tipo de transmissão na região.

Sapucaia, apesar de estar localizada numa região montanhosa de passagem da Serra da Mantiqueira, apresenta vegetação rasteira sem grande cobertura de mata. A não realização de inquérito entomológico e epidemiológico na região, não permite o estabelecimento de qualquer hipótese sobre a possibilidade de autoctonia na área. Os anticorpos identificados nas amostras da paciente foram para MSP1-19, CSP de *P. vivax* clássico, VK 247, *P. vivax*-like, CSP de *P. malariae* e *P. falciparum*.

Aspectos clínicos dos casos

Casos de malária no Rio de Janeiro (autóctones e importados) são diagnosticados na maioria das vezes após extensa investigação de outras etiologias de febre. Neste estudo, o tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 16 dias, variando entre nove e 28 dias, o que pode caracterizar em alguns casos a Febre de Origem Obscura (FOO, > 21 dias (Gaeta et al 2006, Hayakawa et al 2012, Kaya et al 2013)). O atraso no diagnóstico de casos autóctones está associado ao desconhecimento da população, devido à baixa divulgação da doença na região, e dos profissionais médicos, que supõem que indivíduos que não se deslocaram para áreas endêmicas de malária não podem ter a doença. Por ser evento pouco frequente em regiões não endêmicas, a malária pouco faz parte do currículo das escolas médicas sediadas nessas regiões, que associam a doença apenas aos países africanos e à floresta Amazônica (Wanderley et al 1994). Outras patologias são privilegiadas como hipótese diagnóstica alternativa, como dengue em 61,5% dos indivíduos deste estudo, mesmo nos casos em que a febre excedia os clássicos sete dias da arbovirose.

Bressan (2010) salienta que a malária em sua apresentação inicial, com poucos dias de febre, pode ser facilmente confundida com Febre do Dengue (FD), já que os sinais e sintomas, mesmo que mais prevalentes em uma ou em outra entidade, não são tão específicos. Nos pacientes atendidos na cidade do Rio de Janeiro a informação de viagem à área endêmica é de extrema importância para a presunção da malária como possível etiologia, embora nos casos apresentados nesse estudo a malária tenha sido contraída na região de Mata Atlântica no estado.

A FD foi excluída em todos os indivíduos incluídos no estudo através de exames sorológicos. A demora do diagnóstico de malária nesses pacientes pode favorecer a manutenção da circulação do agente etiológico, infectando vetores, possibilitando trocas entre diferentes hospedeiros, com recombinações do plasmódio e assim produzir novos casos em regiões receptivas, com presença de vetores (Marques et al 2008) e gerando a possibilidade de casos introduzidos.

Diferentemente do descrito em pacientes com malária autóctone na Mata Atlântica do estado de SP, com sintomatologia atípica e transitória (Curado et al 1997) e oligo ou assintomáticos (Duarte et al 2008, Couto 2008, Couto et al 2010), todos os pacientes deste estudo apresentaram síndrome febril: febre acompanhada de cefaleia, mialgia, fraqueza, indisposição e sensação de cansaço, seguida da tríade clássica da malária, que só não esteve presente em um caso. A febre foi apresentada em 100% dos casos e foi o motivo de busca por atendimento médico; para a maioria a febre era inicialmente contínua e tornou-se periódica (terça) após uma mediana de nove dias. A presença da tríade clássica incluída a febre com característica terça pode ser elencada como achado capaz de auxiliar na suspeita clínica de malária para médicos pouco familiarizados com a doença.

Icterícia, esplenomegalia e hepatomegalia estiveram presentes em mais de 40% casos, sem, entretanto, representar gravidade. Bressan (2010) salienta que a presença de icterícia praticamente exclui o diagnóstico de FD. O papel do baço na malária vivax é mal compreendido, embora seu aumento pareça ser semelhante à malária falciparum (principal local de remoção de hemácias). Douglas et al (2012) sugerem que o aumento da remoção e destruição dos glóbulos vermelhos infectados e não infectados em malária por *P. vivax* é mais proeminente durante os estágios iniciais da infecção.

A malária afeta quase todos os componentes do sangue e, anemia e trombocitopenia são as alterações hematológicas mais frequentemente observadas (Guimarães de Lacerda et al 2011). Neste estudo, nenhum paciente apresentou anemia grave ($Hb < 7g/Dl$), contudo, 40% apresentou anemia ($Hb < 11g/dL$). Sabe-se que a anemia é uma consequência comum das infecções por *P.vivax*, que tem uma forte predileção por reticulócitos. A história natural destes eritrócitos infectados é hospedar o parasita replicante e romper-se após 48 horas com liberação de merozoítas na corrente sanguínea, portanto, o longo período de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico, pode contribuir para o aparecimento da anemia. Além disso, para cada célula infectada, cerca de 34 células não infectadas são destruídas (Douglas et al 2012).

A trombocitopenia esteve presente em quatro (40%) dos dez pacientes com a informação disponível. Apenas um paciente apresentou trombocitopenia grave, sem sangramento associado. Apesar de não ser um critério para a malária grave, trombocitopenia é uma das complicações mais comuns nos casos de malária, sendo frequentemente observada em malária vivax (Guimarães de Lacerda et al 2011), sem elucidação exata do seu mecanismo de origem.

Um indivíduo, portador do vírus HIV, em uso de terapia anti-retroviral, não teve sua evolução clínica diferente da observada nos demais pacientes, apesar de dados da literatura sugerirem que a infecção pelo HIV incrementa a infecção por *Plasmodium* (Martin-Blondel G et al 2007, Suárez-Mutis et al 2005, Chirenda & Murugasampillay 2003).

Apesar da indicação de internação em quatro casos, somente um paciente com comorbidade evoluiu com complicações. Este caso (caso 8), como já mencionado acima, não apresentava características de transmissão autóctone, e provavelmente foi introduzido na região, devido as suas características clínicas e parasitemia, muito

superior aos demais casos. A internação foi instituída no outros três casos para investigação diagnóstica de febre sem foco, de evolução subaguda. A melhora na suspeição diagnóstica da febre pode também reduzir os custos com o cuidado da doença evitando-se a internação hospitalar.

Apesar da parasitemia sub-microscópica só diagnosticada através do exame molecular, após 18 dias de evolução da doença, um paciente teve a sua sintomatologia exuberante remitida logo após o início do tratamento (Brasil et al 2013). Este fato aponta que mesmo em baixa densidade o parasito foi capaz de causar sintomas, além de ativação policlonal de células B, mostrando-se patogênico, sugestão de uma baixa adaptação do parasita ao homem.

Aspectos morfológicos, moleculares e sorológicos dos parasitos

Aspectos morfológicos

O diagnóstico de rotina para malária é historicamente baseado na detecção do parasita no sangue, e o padrão-ouro continua sendo o microscópico direto, através do exame de gota espessa corada pelo Giemsa (Brasil 2001, 2005, 2008).

Além deste, existem outros métodos incluindo técnicas moleculares e imunológicas. O diagnóstico rápido e eficiente das infecções causadas por *Plasmodium* tem sido foco de pesquisas em todo o mundo, já que a adoção de tratamento apropriado depende diretamente da identificação da espécie responsável pela doença. Segundo Martens & Hall, (2000), no ano 2000, quando ocorriam entre 300 a 500 milhões de casos em todo o mundo, estimava-se que um diagnóstico de qualidade era capaz de evitar, potencialmente 100.000 mortes em decorrência da malária e 400.000.000 tratamentos desnecessários.

Foi realizado o exame microscópico direto em todos os 14 casos abordados no presente trabalho e em 13 (93%) deles ele foi suficiente para se afirmar o diagnóstico de malária. Em um caso, após sucessivos exames parasitológicos diretos e teste rápido negativos, o exame molecular foi a ferramenta utilizada para o diagnóstico (Brasil et al, 2013). A infecção por *P. falciparum* foi identificada por PCR em um dos pacientes com malária vivax diagnosticada por microscopia. Cerutti (2007) justifica as baixas parasitemias observadas na maioria dos casos adquiridos na Mata Atlântica do ES à “má” adaptação do parasito ao homem, já que mal adaptados, se multiplicariam de forma mais lenta do que no seu hospedeiro habitual, os possíveis reservatórios símios. Sob o ponto de vista evolucionário, entretanto, podemos considerar que uma multiplicação menor e mais vagarosa permitiria uma infecção mais crônica, com menor chance de evolução rápida para a sintomatologia (que requereria tratamento) ou o óbito, e na verdade resulte de infecção por um parasito “mais adaptado” ao seu hospedeiro. Um parasito que evolui com muita sintomatologia em um hospedeiro apesar de baixa parasitemia (um parasito de maior patogenicidade) também poderia ser considerado menos adaptado quando comparado a um parasito que requeira altas parasitemias para resultar em maior patogenicidade ou um que não costume causar sintomas e evolua com baixas parasitemias durante a infecção.

Em todos os demais casos, a espécie visualizada no exame direto foi *P. vivax*, com a maioria apresentando parasitemia inferior a 300 parasitos/ mm³ (+/2), e, talvez, em decorrência desta baixa parasitemia, a maioria das amostras (75%) foi negativa no teste rápido. Este se baseia no reconhecimento de antígenos do parasita na circulação sanguínea a partir de anticorpos monoclonais, e sabidamente não apresenta boa sensibilidade em amostras com densidade parasitária variando entre 100 e 1000 parasitos por microlitro (Huong et al 2002 APUD Lima 2011). Segundo a indicação do

teste utilizado em todas as amostras (OptiMAL-IT®), o limiar de detecção destes testes é de 50-100 parasitas por ul de sangue (informação disponível em http://www.tcsbiosciences.co.uk/optimal_it.php?genre=clinical).

A análise microscópica das lâminas positivas demonstrou que fenotipicamente as amostras se apresentavam de forma atípica. Todas as formas evolutivas (trofozoítos, esquizontes e gametócitos) foram observadas, o que é compatível com o diagnóstico de *P. vivax*; os trofozoítos maduros, apesar de similares às formas irregulares de *P. vivax*, apresentavam citoplasma bem mais compactado, ou seja, menos espalhado, do que aqueles observados comumente para *P. vivax*. Com relação ao tamanho, as hemácias estavam levemente aumentadas, mas com morfologia preservada, diferente do usualmente observado nas parasitadas por *P. vivax*, onde a movimentação amebóide dos trofozoítos acaba por gerar deformações no estroma das hemácias. Os poucos gametócitos observados se assemelhavam aos de *P. vivax*, porém pareciam menores, mais compactos, e com granulação difusa e um pouco mais escuras.

O número de merozoítos no interior dos esquizontes observados estava em menor quantidade quando comparado com os de *P. vivax* amazônico. Em poucos esquizontes vistos foram observados em torno de 6 a 12 merozoítos compatíveis com as formas comumente observadas em *P. ovale*, já que, segundo o “Manual de diagnóstico laboratorial da malária” (Brasil 2009), o número de merozoítos comumente observados é de 12 a 24 em cada esquizonte. Talvez, este número reduzido de merozoítos seja uma das explicações das baixas parasitemias observadas nos casos aqui descritos.

Os aspectos morfológicos atípicos para *vivax* observados neste estudo são semelhantes a outros estudos de malária autóctone realizados no estado do ES e de SP (Cerutti 2007, Carvalho et al 1985).

A formação da junção e a consequente invasão do merozoíto nas infecções por *P. vivax* é mediada pela interação entre a Duffy binding protein (DBP) e seu receptor nos eritrócitos, o antígeno do grupo sanguíneo Duffy (Fy), também conhecido como receptor DARC para quimiocinas (DARC, Duffy Antigen Receptor for chemokines) (Cerávolo 2007, Souza-Neiras et al 2007, Escalante et al 2005). Fy tem dois alelos distintos imunologicamente, chamados de FyA e FyB (Cui et al 2003), resultantes de um único ponto de mutação. Fya, em comparação com Fyb, diminui significativamente a ligação da proteína de ligação Duffy-Pv (PvDBP) na superfície de eritrócitos, e é associado com um risco reduzido de doença clínica em seres humanos (King et al 2011). Com base nestes dados da literatura resolvemos testar o perfil do grupo sanguíneo Duffy/DARC dos casos e como resultado, a maioria das amostras testadas apresentava perfil FyA/FyB, 30% perfil FyB/FyB e 10% perfil FyA/FyA. Cavasini et al (2007) descrevem que indivíduos FyA/FyB são mais suscetíveis a infecção por *P. vivax*, de acordo com o observado neste estudo.

King et al (2011), descreveram que FyB foi associado ao aumento da infecção e da doença quando comparado a FyA, o mesmo ocorreu neste estudo, entretanto, como a amostragem era pequena e testes estatísticos não foram realizados, apenas inferências podem ser feitas.

Aspectos moleculares

A PCR como ferramenta diagnóstica foi utilizada em 10 casos e a identificação de infecção por *P.vivax* ocorreu em todos eles. Hermesen et al (2001) e Lee et al (2002) apontam que a detecção de *Plasmodium spp* através do exame molecular é de 0,02 parasitas / mL e 0,1 parasitas / mL, sendo considerado um método altamente sensível e específico e em um caso identificou infecção mista (*P.vivax* e *P.falciparum*). Este achado de infecção mista em uma paciente oriunda da Mata Atlântica (região do Sana), sem nenhuma história de deslocamento para áreas endêmicas, aponta para a possibilidade de circulação desta espécie de plasmódio na região. Tal parasito seria sensível à Cloroquina, já que o exame direto e molecular de controle pós tratamento se tornaram negativos para ambas as espécies. Uma outra possibilidade seria uma baixa adaptação de um parasito proveniente de macacos cuja infecção em humanos não evoluiria além de um estágio inicial.

Outros estudos conduzidos na Mata Atlântica (Guapimirim e Espírito Santo) mostraram também infecção local por *P. falciparum* (Miguel 2011, Cerutti 2007). Acreditamos que erros de identificação de espécie podem ocorrer, independente do método utilizado, como evidenciado por Ta et al (2014) em um caso inicialmente diagnosticado como *P. vivax* (PCR) e *P. malariae* (exame direto) que na verdade era *P.cynomolgi* evidenciado pelo sequenciamento do parasito. A identificação de espécies diversas que infectam primatas e podem em condições especiais causar doenças em homens provavelmente ocorre em maior número do que realmente este fenômeno é diagnosticado. A possibilidade da existência de outras espécies de parasitos, ainda desconhecidos, também é possível.

A malária humana é provavelmente tão antiga quanto à humanidade; estudos filogenéticos sugerem que *P.vivax* teve origem em um parasito de primatas do Sudeste Asiático (Escalante et al 2005), como resultado de troca de hospedeiros (primata não-humano para os humanos). A introdução de *P.vivax* no continente americano provavelmente ocorreu a partir da colonização dos europeus e tráfico de escravos (Alisson 2009). Outra hipótese seria as migrações de populações do Sudeste Asiático através do estreito de Bering, com a malária sendo introduzida a macacos neotropicais, iniciando a transferência: homem-primata. Estudos apontam que *P.cynolmolgi* (parasito encontrado naturalmente em primatas asiáticos), é uma espécie-irmã de *P.vivax*, e que *P.simum* é idêntico a *P.vivax* (Corjano & Escalante 2006, Escalante et al 2005, Escalante et al 1995).

P. vivax apresenta uma enorme diversidade fenotípica e os marcadores mais comumente utilizados em estudos de genética de populações são os microssatélites (Araújo 2012), que são regiões de DNA que contêm repetições em série. Os microssatélites representam regiões instáveis do genoma, com uma taxa de mutação elevada; esta instabilidade resulta em seu elevado grau de polimorfismo (Rodrigues 2012). Análises epidemiológicas da diversidade genética e estrutura populacional dos plasmódios são essenciais para o entendimento da dinâmica da transmissão da malária (Brito & Ferreira, 2011).

A análise da genotipagem dos parasitas realizada tanto nos casos humanos de malária quanto em primatas não humanos, identificados neste trabalho como prováveis reservatórios de plasmódio, é o primeiro a acontecer no estado do Rio de Janeiro, e busca o entendimento sobre a possibilidade da malária como zoonose nas áreas montanhosas do estado. Buscou-se observar e explorar a diversidade genética nos diferentes hospedeiros e nas diferentes regiões em que os casos ocorreram a fim de se

tentar entender se o mesmo plasmódio circula nas diferentes regiões, distantes em média 45 km uma da outra. Assim como Guimarães et al 2012, mostram que a diversidade em parasitos humanos é maior do que em símios, nosso trabalho também observou que existe uma maior variabilidade em parasitos humanos.

Apesar de alguns casos serem das mesmas regiões, a genotipagem dos microssatélites evidenciou a diversidade já citada; na análise do microssatélite MS1, todos os alelos observados são novos, nunca outrora detectados em humanos e/ou primatas; o mesmo ocorreu nas amostras de primatas na pesquisa deste alelo. Já a análise do microssatélite MS5 apontou que todos os alelos identificados já foram descritos em amostras humanas e, além disso, também já foram identificados em amostras de primatas oriundos do estado de Santa Catarina (Cristiana Brito, comunicação pessoal). A análise do microssatélite MS6, apontou que na maioria das amostras, os alelos observados são comuns a humanos e primatas, identificados até o momento, apenas neste estudo. No microssatélite MS7, os resultados mostram alelos já descritos anteriormente em amostras humanas. No marcador MSP1b12, não ocorreu muita variação entre as diferentes regiões e o alelo mais encontrado nas amostras humanas já foi descrito em amostras humanas. Já em MSP1b10, em todas as amostras, tanto de humanos quanto de símios, foi observado um alelo novo, nunca detectado anteriormente. Os métodos de tipagem de microsateletes são sujeitos a variação entre laboratórios, o que reduz a possibilidade de comparação de resultados obtidos (Rodrigues 2012).

Aspectos Sorológicos

Os procedimentos sorológicos em busca de anticorpos da classe IgG neste estudo foram realizados após o diagnóstico, e utilizados apenas como estratégia da pesquisa. A detecção de IgG nos casos é importante, pois confirma a existência de exposição aos antígenos e indica a ocorrência de transmissão do parasito que carrega o antígeno contra o qual se busca a resposta imune. Em estudo conduzido por Park et al (2000), anticorpos IgG anti-PvMSP1 foram detectados no soro por período que variou de 4 a 6 meses, após o tratamento com drogas antimaláricas.

Em nosso estudo, dos dez casos testados frente ao antígeno PvMSP1-19, apenas um não foi responsivo. A proteína MSP1-19 é caracterizada como altamente imunogênica, e indutora de proteção eficaz contra formas sanguíneas do plasmódio. Estudos realizados na Amazônia mostraram que indivíduos com malária por *P. vivax* frequentemente apresentam altos títulos de anticorpos PvMSP1-19 (Soares et al 1999, Cunha et al 2001, Rodrigues et al 2005, Cumbane 2011). IgG Anti-PvMSP1-19 foi detectada 176 dias após o início dos sintomas (cerca de três meses e meio) em um dos casos; esta observação, em um paciente em região sem transmissão ativa, pode demonstrar o tempo em que IgG se mantém circulante.

A IFI permite a detecção de IgG a partir do sexto dia e até cerca de três anos após a infecção por *P. vivax* (Cerutti 2007). Neste estudo, utilizou-se antígeno bruto de amostras coletadas em área endêmica (Manaus, AM). Das 40 amostras testadas, 77,5% (n= 31) foram positivas, e o título máximo encontrado foi de 1:3200. Apesar de ser considerada a técnica de referência na sorologia para malária, Cerutti (2007) relata que a sensibilidade da IFI, habitualmente de 60% para *P. vivax* em primoinfectados, foi de 96% de positividade nos 50 casos de seu estudo.

O estudo da resposta imune às variáveis de CSP de *P. vivax* pesquisadas neste estudo apontou que, 10 (91%) dos 11 indivíduos incluídos no estudo, tiveram pelo menos uma amostra positiva para a variante VK 210, cinco indivíduos (45%) tiveram pelo menos uma amostra positiva para variante *vivax-like* e cinco indivíduos (45%) tiveram pelo menos uma amostra positiva para variante VK 247. Diferentemente do que sempre se especulou de que a malária autóctone no estado do RJ era causada pela variante *P.vivax-like*, neste estudo a variável mais observada foi a *P.vivax-VK210*, considerada a clássica da espécie.

Os peptídeos sintéticos utilizados neste estudo são altamente específicos, e embora a possibilidade de reação cruzada seja, portanto, quase desprezível, Yamasaki et al (2012) a consideram em seus achados em macacos no estado de SP. A presença de positividade em uma mesma amostra para mais de uma variável também já ocorreu nos casos autóctones identificados na região montanhosa do estado do ES (Cerutti 2007), e provavelmente atestam somente o contato com os esporozoítos inoculados pelo vetor.

A ocorrência de anticorpos para CSP de *P.malariae/brasilianum* foi verificada em quatro indivíduos, sendo três do Sana e um de Sapucaia. Não se observou resposta para o *P.malariae/brasilianum* nas amostras dos casos da Serra dos Órgãos. O achado de resposta imune contra *P.malariae/brasilianum* na região do Sana merece ser mais investigado, posto que se encontrou, através de exames moleculares, amostras positivas para *P.brasilianum* nos primatas não humanos incluídos neste estudo. Pesquisadores de outras localidades cobertas por Mata Atlântica como Cerutti (2007), Couto et al (2010) e Curado et al (2006) também encontraram amostras positivas para *P.malariae/brasilianum* em seus estudos e sugerem que a presença de anticorpos para *P.malariae*, em humanos, indicam a presença de primatas não humanos como reservatórios de *P.brasilianum* na região.

Dos 11 casos testados, 10 apresentaram pelo menos um marcador para infecção por *P. falciparum*. Em todas as regiões (com exceção de Monte Olivette) os pacientes apresentaram anticorpos para CSP de *P. falciparum*. A paciente que apresentou exame molecular positivo para *P. falciparum*, também apresentou sorologia positiva para esta mesma espécie. A presença de anticorpos para *P.falciparum* em indivíduos oriundos da Mata Atlântica já foi descrita por outros autores (Cerutti 2007, Gomes et al 2008). Essa positividade no exame sorológico sugere que os casos também foram expostos a esporozoítos desta espécie, ou então aponta para a remota possibilidade de reação cruzada. Gomes et al (2008) inferem que a positividade para *P. malariae* e *P. falciparum* possivelmente é explicada pela exposição dos indivíduos aos mosquitos vetores, que por sua vez tem cargas parasitárias muito baixas destes parasitos, incapazes de causar infecção e/ou doença. Descrição de símios do novo mundo infectados por *P. falciparum* foram relatados no estado de SP (Duarte et al 2008, Yamasaki 2011) e, recentemente, no estado de Rondônia (Araujo et al 2013).

Segundo Araujo et al (2013), a observação deste parasita em macacos na região amazônica aponta que a transferência de *P. falciparum* ocorre a partir de seres humanos para os animais e pode ser um evento frequente nesta região. É possível que a transferência de parasita ocorra também no sentido oposto, ou seja, a partir de primatas não humanos para humanos, em áreas onde a transmissão entre humanos não é importante; já que estudos experimentais em primatas da família *Aotidae* e *Cebidae* já confirmaram que o parasita é capaz de completar o ciclo, infectar mosquitos e, portanto, ser transmitido para humanos. Cerutti (2007) acredita também que símios do novo mundo poderiam estar albergando *P. reichenowi*, que é bastante semelhante ao *P.falciparum* (Coatney 1971) e este parasita, quando transferido para seres humanos, teria dificuldades para se multiplicar em magnitude suficiente para causar doença,

devido a sua baixa adaptação nesse hospedeiro. Essa hipótese deixou de ter maior relevância depois que a equipe de Beatrice Hahn (Liu et al 2010) mostrou que o plasmódio mais parecido com o *P.falciparum* humano é o *P.falciparum* encontrado em gorilas. Cormier (2010) não descarta a possibilidade de macacos do Novo Mundo atuarem como reservatórios de *P. falciparum*, e outras espécies de plasmódio. Até o momento, não está esclarecido se *An cruzzi* também transmitiria *P. reichenowi* e/ou *P.falciparum*.

Inquérito soro epidemiológico

A decisão por não realizar exame direto (gota espessa e distensão sanguínea) dos contactantes dos casos de malária autóctone, foi tomada baseada na baixa sensibilidade do exame direto em infecções com baixa parasitemia, e na experiência de estudos semelhantes realizados também em áreas cobertas por Mata Atlântica, e que demonstraram que a possibilidade de se encontrar uma amostra positiva é muito reduzida. Gomes et al (2008) ao analisar gota espessa e distensão sanguínea de 861 moradores de uma localidade no estado de São Paulo não encontrou nenhuma amostra positiva para *Plasmodium spp*, assim como Curado (2006) que analisou gota espessa e distensão sanguínea de 318 indivíduos moradores de áreas com casos de malária autóctone também no estado de SP, e Cerutti (2007) que analisou amostras de gota espessa de 1777 indivíduos contactantes dos casos de malária autóctone no ES, e também não encontrou nenhuma amostra positiva. Miguel (2011) ao analisar 324 amostras de gota espessa e distensão sanguínea coletadas em Guapimirim observou apenas uma amostra positiva para *Plasmodium spp* (sem confirmação da espécie), em um indivíduo oriundo de uma localidade sem descrição de casos. A amostra deste indivíduo foi submetida a exame molecular e o resultado foi negativo.

Praticamente todos os contactantes de vizinhança dos casos de malária autóctone investigados neste estudo foram incluídos no inquérito soro-epidemiológico. No caso do Garrafão, todas as pessoas que entraram em área de mata com os casos foram investigados. Entre o total de entrevistados que afirmaram viagem para área endêmica de malária, a maioria era indivíduos do grupo do Garrafão. Todos com relato de deslocamento para área endêmica tiveram amostras negativas em sorologia. Do total de entrevistados na região, nenhuma amostra teve exame molecular positivo e apenas uma amostra foi positiva na sorologia, em indivíduo sem relato de deslocamento para áreas endêmicas.

Na localidade de Monte Olivette, o condomínio em que os casos ocorreram conta com 46 casas, a maioria fechada durante os dias de semana, com população flutuante nos finais de semana. Diferentemente de estudo anterior realizado no mesmo local em que no inquérito molecular um indivíduo foi positivo para *P. malariae* (Miguel 2011), nesse estudo nenhum resultado foi positivo entre os indivíduos expostos. Por outro lado, no inquérito sorológico amostras de 38 indivíduos (56% dos pesquisados em Guapimirim) nas localidades de Garrafão e Monte Olivette (14 e 24 amostras respectivamente) foram positivas em 7.1% e 58%, utilizando IgG anti-PvMSP1₁₉, proporção superior ao estudo de Miguel (2011), [13,3% no Monte Olivette (n=2) e 3,8% no Garrafão (n=2)] e de Curado, 2006, (34.9%), no estado de SP. Nenhuma das 68 amostras pesquisadas nas duas regiões foi positiva para IgG de *P. falciparum* (estrato antigênico). Miguel (2011) observou em Guapimirim que o ingresso na mata foi considerado comportamento de risco para infecção. A alta frequência de sorologias positivas entre a população residente no condomínio em Monte Olivette, quase dois anos após a identificação do primeiro caso, associado à presença de anofelinos, cujas

atividades aumentam em regiões de noites úmidas, neblinas e chuvas fracas (Barros Barreto 1940), favorecem a hipótese de que o plasmódio circula na região.

O distrito do Sana é dividido em três áreas, Barra do Sana, Cabeceira do Sana e Arraial do Sana, onde se encontra a maior parte da população. É uma região que recebe muitos turistas, mas cujo fluxo se localiza principalmente na Barra e no Arraial do Sana. A Cabeceira do Sana é a área menos povoada do distrito, onde ocorreu a transmissão da malária autóctone. Como a densidade populacional na região é baixa e a distância entre as moradias relativamente grande, o limite de dois quilômetros para busca ativa e realização do inquérito em alguns momentos foi extrapolado. No inquérito soro epidemiológico realizado na região foram incluídos 53 indivíduos, dos quais 50% foram reativos para MSP1₁₉, amostra constituída sobretudo por ex-moradores do local provável de infecção do caso 07.

Macaé de Cima tinha as mesmas características do Cabeceira do Sana: provável local de infecção afastado do centro urbano com baixa densidade populacional e onde 50% (quatro) dos oito indivíduos expostos, apresentavam reatividade para MSP1₁₉ sendo que os moradores locais apresentavam alta titulação e inquérito molecular negativo, dando indício de contato prévio com o parasito.

Em ambas as localidades, as amostras reativas para MSP1₁₉ ao longo do tempo concentrados na área contígua à mata com alta titulação, demonstram a permanência da fonte de infecção nessas regiões. A presença de vetores obtidos em diversas ocasiões favorecem a transmissão local permanente. A ausência de outros casos no período de estudo pode ser atribuído à baixíssima densidade populacional, enquanto que a alta soropositividade pode ser explicada pelos casos de infecção (bem sucedida ou frustra – que não evolui além da infecção nos estágios iniciais) prévia com apresentação subclínica com quadro auto-limitado de febre inespecífica ou mesmo de infecção

assintomática, o que não ocorreu durante a investigação, quando todas as pesquisas de DNA de plasmódio foram negativas.

Ao contrário, na localidade de Santana de Japuiba, região em que um número maior de indivíduos foi incluído (n=121), apenas cinco (4,3%) tiveram amostra positiva para anticorpos anti-MSP-1₁₉, a menor frequência observada quando comparada as demais regiões pesquisadas neste estudo. A baixa prevalência de anticorpos na população associada à ausência de *An cruzii*, e a alta parasitemia do caso, sugerem a possibilidade de caso de malária vivax, introduzido na região.

Mesmo com todos os indivíduos negativos no exame molecular, a possibilidade da existência de indivíduos assintomáticos entre a população não pode ser descartada. Segundo Maselli et al (2014) infecções assintomáticas não diagnosticadas, podem ser responsáveis pela manutenção da transmissão do parasito, inclusive por hemotransfusões; já que em áreas não endêmicas, candidatos à doação de sangue são submetidos apenas a uma entrevista, antes de doar sangue. Após a entrevista, doadores de sangue em potencial podem ser rejeitados ou aceitos para doação, sem a aplicação de uma triagem laboratorial para a infecção pelo *Plasmodium* (Brasil 2004a). Levando em consideração a circulação de *Plasmodium spp* em áreas não-endêmicas e a desobrigação de normas para o rastreio de *Plasmodium* nessas áreas, é plausível supor que a transmissão transfusional de malária pode ocorrer (Maselli et al 2014, Pina-Costa et al 2014 – submetido). Em estudo conduzido no estado de SP Maselli et al (2014), utilizando PCR em tempo real, foram estudados 1.108 doadores de sangue saudáveis, dos quais 84 (7.41%) foram positivos para *Plasmodium*, a maioria (n=57) para *P.falciparum*.

Inquérito Entomológico

O inquérito entomológico ocorreu em conjunto com a coleta das amostras de sangue da população. Apenas na região do Sana a coleta dos vetores se estendeu por 15 meses, e em algumas ocasiões foi isolada da coleta de amostras da população. O número de espécimes coletados em todas as regiões foi muito baixo, o que sugere baixa intensidade de transmissão da malária (Elliot 1972 APUD Cerutti-2007). Houve predomínio de vetores do subgênero (*Kerteszia*), em especial *An cruzii*, principal vetor da malária autóctone na região de Mata Atlântica Brasileira (Deane 1992, Curado et al 2006, Marrelli et al 2007, Cerutti et al 2007, Rona et al 2009, Neves et al 2013, Duarte et al 2013); vetor primário da malária autóctone na região da Serra do Mar (Lorenz et al 2012); e vetor também das variantes de CS de *P.vivax* (Branquinho et al 1997). *An. cruzii* estava presente em todas as regiões deste estudo, com exceção da localidade de Santana de Japuíba. Rona et al (2009) descreve que as fêmeas de *An. cruzii* são fortemente antropofílicas e tem preferência em picar durante a noite. Segundo os dados da SESDC, apresentados em 2009, não foram identificados espécimes de *An cruzii* nos municípios de Guapimirim, Macaé e Cachoeiras de Macacu (disponível em http://www.sms.rio.rj.gov.br/coe/Apresenta%E7%F5es/Mal%E1ria/I%20Encontro%20Macrorregional%20de%20Mal%E1ria%20RJ%20DEZ_2009.pdf).

Na localidade de Cabeceira do Sana o maior número de vetores foi capturado no mês de dezembro (2011) durante o verão, entretanto, não foram identificados casos neste mês, nem nos meses seguintes. Outro pico do número de vetores foi coletado no mês de setembro (2012), também sem associação com casos. O mês de março (2013) foi o segundo mês com maior número de espécimes coletados e quando dois casos de

malária foram identificados na região. No mês de fevereiro, um caso foi identificado na região, sendo que no mês anterior (janeiro) a coleta de vetores também apresentou um pico de espécimes capturados. A pesquisa de vetores dissociadas do tempo de diagnóstico dos casos de malária e o reduzido número de casos não permitem qualquer inferência sobre a relação entre estação do ano, número de mosquitos capturados e casos de malária. Cabe ressaltar que o relatório apresentado pela SESDC aponta para a presença de *An darling*, *An aquasalis* e *An albitarsis* espécies não encontradas em nosso estudo.

Na região de Cachoeiras de Macacu foram capturados um total de 18 anofelinos todos do subgênero *Nyssorhynchus*, com predomínio de *Anopheles albitarsis* e *An aquasalis*. Não foram capturados vetores do subgênero (*Kerteszia*). Segundo os dados da SESDC (2009), neste município havia descrição apenas de *Anopheles albitarsis*. Vetores do subgênero *Nyssorhynchus* estão classicamente incriminados em casos introduzidos fora de regiões endêmicas (Pina-Costa et al, 2014, submetido).

A análise molecular da glândula salivar não identificou nenhum mosquito com plasmódio, o que não afasta a transmissão local, já que a densidade vetorial era baixa e houve uma dissociação temporal entre a ocorrência dos casos e a captura dos mosquitos. Em estudos semelhantes realizados em áreas endêmicas de malária com uma população muito superior de vetores também não é comum o achado de esporozoíta na glândula salivar do *Anopheles* (Oliveira-Ferreira et al 1990).

Primatas não humanos

Foram examinados 30 primatas das famílias *Cebidae* e *Atelidae* mantidos no CPRJ, dos quais nove tiveram PCR positivo (cinco infectados por *P.malariae/P.brasilianum* (56%), três por *P. vivax/P. simium* (33%) e um (11%) por

P.malariae/P.brasilianum e *P. vivax/P. simium* (infecção mista)), de acordo com estudos anteriores, que descrevem essas espécies como causas de infecção natural em símios no Brasil (Araújo et al 2013, Guimarães et al 2012, Yamasaki et al 2011, Cerutti 2007, Deane 1992, Deane 1970, Deane 1969). Os plasmódios simianos também são transmitidos por mosquitos do gênero *Anopheles* e seu ciclo de vida é muito semelhante a dos plasmódios humanos; em alguns casos a infecção pode ser transitória e em outros pode persistir por muitos anos (Yamasaki 2011, Deane 1992, Deane 1970, Deane 1969).

De forma inédita, este estudo observou primatas da família *Cebidae* infectados com *P. simium*, já que, segundo a literatura, *P. simium* é descrito infectando apenas três espécies de primatas *Aloutta guariba*, *Alouatta caraya* e *Brachyteles arachnoids*, e nunca foi descrito na região norte do Brasil ou em outros países, sendo sua distribuição restrita à Mata Atlântica do Brasil (Araújo et al 2013). Nenhum animal era procedente de áreas endêmicas de malária. A presença de plasmódio nesses animais de cativeiro aponta para a circulação de plasmódio na região, confirmada pela investigação do óbito de um primata de vida livre do gênero *Alouatta* que teve amostra do baço positiva para *P. simium/P. vivax*.

Apesar da maioria dos animais estar infectada por *P.malariae/P.brasilianum*, assim como estudo conduzido na maioria dos estados brasileiros por Deane (1992), nenhum caso humano foi positivo para *P. malariae* e a frequência de anticorpos no inquérito sorológico dos casos para essa espécie também foi baixa. Uma explicação seria que, em hospedeiros naturais *P. brasilianum* apresenta parasitemia muito baixa, sendo sua infecção por vezes inaparente (Yamasaki 2011).

De acordo com diversos autores (Araújo et al 2013, Guimarães et al 2012, Yamasaki et al 2011, Cerutti 2007, Escalante et al 2005, Deane 1992, Deane 1970, Deane 1969), *P. simium* em vários isolados é idêntico morfológicamente a *P.vivax*,

sendo então didaticamente apontado como *P.vivax* em infecções humanas e *P. simium* em infecções em primatas (Escalante et al 2005). Nesse estudo, demonstrou-se alelos novos de *P. simium/P. vivax* tanto em amostras de casos de malária em humanos como em casos de infecção em primatas não humanos, sugerindo uma diversidade de trocas de material genético entre os *Plasmodium* de diferentes hospedeiros (humanos e primatas). Esses alelos comuns de plasmódio em humanos e primatas foram pela primeira vez detectados nesse estudo.

Em relação aos aspectos sorológicos, a não observação de reatividade nas amostras dos primatas testadas para MSp1.19 possivelmente ocorreu, em virtude da inadequação dos reagentes utilizados para a análise da resposta imunológica das espécies de primatas não humanos pesquisadas.

CONCLUSÕES

Este estudo pretendeu apontar alguns dos locais em que ocorrem os casos de malária no estado do RJ, a partir dos casos de malária considerados como autóctones da mata Atlântica vistos no DFA do IPEC (Fiocruz). O estudo identificou situações epidemiológicas distintas que foram agrupadas em dois perfis:

- 1- Os 12 casos que ocorreram em regiões montanhosas, de Serra (Guapimirim, Teresópolis, Sana, Macaé de Cima e Lumiar) com agente etiológico fenotipicamente similar ao *P.vivax*, cursando com baixa parasitemia, sintomatologia que se inicia com febre diária, para depois assumir padrão terçã clássica com evolução sub aguda, responderam ao tratamento preconizado para *P.vivax*. A exposição ocorre próximo a áreas de mata fechada e parcialmente preservada, os vetores incriminados na transmissão são exclusivamente mosquitos do sub-gênero *Kerteszia* (particularmente *Anopheles kerteszia cruzii*) e a população vizinha contactante apresenta frequências elevadas de sorologia positiva para a proteína 1-19 da superfície do merozoíta (MSP1-19). As características das regiões associadas à presença do vetor apoiam a hipótese da malária ser autóctone nestas localidades de vales e montanhas. A possibilidade de primatas não humanos como reservatórios de plasmódio, poderia explicar as baixas parasitemias encontradas, resultado de uma multiplicação mais lenta do parasito, pouco patogênico no homem (Cerutti et al 2007).

As localidades de Santana de Japuiba (Cachoeiras de Macacu) e Sapucaia são áreas de planície e sugerem o perfil epidemiológico 2, observado neste estudo:

- 2- Casos secundários introduzidos a partir de caso índice importado, geralmente identificados em áreas de planície, baixadas e planalto outrora malarígenas, receptivas, já que tem presença de vetores do subgênero *Nyssorhynchus*. O plasmódio encontrado na maioria dos casos se assemelha ao *P. vivax* tradicional no que se refere aos aspectos clínicos e de parasitemia, o vetor observado foi *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, e a população vizinha contactante apresenta baixa frequência de sorologia positiva para a (MSP1-19).
- A malária autóctone da região de Mata Atlântica do estado do RJ, apresenta evolução sub aguda e apesar disto, seus aspectos clínicos são semelhantes aos casos adquiridos em áreas endêmicas, contudo, sem sinais de gravidade.
 - O plasmódio observado em todas as amostras foi *P.vivax*, embora, morfológicamente diferente do observado em casos adquiridos em áreas endêmicas, e o exame molecular comprovou a infecção por *P.vivax* em todos os casos.
 - As baixas parasitemias da malária nas regiões estudadas e mesmo a ausência de parasitemia ao exame direto de um dos casos de malária com febre de evolução sub aguda são aspectos favoráveis à hipótese de uma interação hospedeiro-parasito distinta da que ocorre habitualmente pelo *P vivax* e mais ainda pelo *P. falciparum*, talvez, este fato esteja relacionado a um parasita pouco patogênico em humanos.

- A amostra com resultado molecular e sorológico para *P.falciparum* sugere a circulação desta espécie na área e pode indicar que primatas não humanos também são capazes de hospedar este parasita, assim como já observado em outros estados inseridos na mata Atlântica e na floresta Amazônica.
- A alta frequência de contactantes com testes sorológicos positivos em regiões não endêmicas apontam para a circulação de plasmódio na região e a necessidade de estudo/triagem nos bancos de sangue destas áreas, com objetivo de evitar a transmissão da malária por via transfusional.
- A identificação de *P.malariae* nas sorologias dos casos e no exame molecular dos primatas também sugere a circulação desta espécie na área. É necessário investigar no futuro para explicar porque essa espécie não gera doença na região.
- A identificação inédita de primatas do gênero *Cebus* sugere que outros gêneros de primatas até então desconhecidos como susceptíveis podem ser infectados por plasmódios e servirem de reservatório na Mata Atlântica.
- É necessária o desenvolvimento de reagentes específicos para análise da resposta imunológica das espécies de primatas não humanos pesquisadas.

Finalmente este estudo demonstra:

- A possibilidade de existir um reservatório primata não-humano desempenhando um papel importante na transmissão da malária na região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro como em outras áreas dos estados do Espírito Santo (região montanhosa) e de São Paulo (Vale do Ribeira e Serra do Mar).
- A possibilidade de existir diferentes espécies do parasita que, pouco patogênicas no homem, causam infecções subclínicas, demonstradas pelas sorologias positivas e em alta titulação de diferentes antígenos de espécies diversas do *Plasmodium* na população exposta.
- A participação dos primatas não-humanos e das espécies de *Plasmodium* transmitidas na Mata Atlântica do Rio de Janeiro só poderá ser confirmada através do sequenciamento do genoma do parasito do caso autóctone e da comparação com o *Plasmodium* infectante do primata.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Algumas limitações foram observadas ao longo deste estudo tais como:

Em relação aos casos:

- Uso de dados secundários.

Em relação ao inquérito:

- O tempo decorrido entre o diagnóstico do caso e a ida à área provável de transmissão para a investigação dos contactantes foi muito prolongado, em alguns casos, em decorrência da dificuldade para a marcação de veículos para o transporte da equipe e o contato com as secretarias de saúde de cada município.
- Apenas antígenos de *P.vivax* foram testados na sorologia da população.
- Inquérito vetorial de curta duração.

Em relação aos primatas:

- Não foi realizado exame direto nos primatas.
- A captura de primatas livres na natureza não foi possível e deverá ser considerada em estudos futuros para se confirmar se estes estão infectados como os mantidos em cativeiro.

- O uso de reagentes pouco específicos para análise da resposta imunológica das espécies de primatas não humanos pesquisadas pode ter resultado em reações falso negativas.

PERSPECTIVAS

- Em estudos futuros, a testagem para outras espécies de plasmódio no inquérito sorológico deverá ser realizada, para o estudo das espécies que circulam nas diferentes regiões.
- Testagem do grupo sanguíneo Duffy/DARC na população contactante a fim de se observar o perfil da população, e se este influencia na aquisição da infecção.
- O sequenciamento molecular do plasmódio encontrado nos humanos e primatas.

REFERÊNCIAS

Allisson AA. Genetic control of resistance to human malária. *Curr Opin Immunol* 2009, 21:499-505

Antinori S, Galimberti L, Gianelli E, Morelli P, Radice A, Acquaviva V, et al. Thrombocytopenia and *Plasmodium vivax* Malaria. *Clinical Infectious Diseases* 2005, 41:1210–1.

Araújo FCF. Estudo comparativo da variabilidade genética de *Plasmodium vivax* provenientes de infecções primária e episódios de recaída após tratamento com Primaquina e Cloroquina. [Dissertação de mestrado]. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz, 2012, 281p.

Araújo MS, Messias MR, Figueiró MR, Gil LHS, Probst CM, Vidal NM, Katsuragawa TH, Krieger MA, Pereira da Silva LH, Ozaki LS. Natural *Plasmodium* infection in monkeys in the state of Rondônia (Brazilian Western Amazon). *Malaria Journal* 2013 12:180.

Arruda ME, Zimmerman RH, Renata MC Souza RMC, Oliveira-Ferreira J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102(3): 367-371.

Azevedo AL. Aspectos da epidemiologia da malária e da biologia de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab em Vales Montanhosos do Sistema de Mata Atlântica. Rio de Janeiro [Dissertação de mestrado]. Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz; 1997, 94p.

Barnwell JW, Galinski MR. Invasion of vertebrate cells: Erythrocytes. In: IW Sherman, Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection. Washington DC: ASM Press: 1998. Cap.7. P. 93-120.

Barros Barreto J. Malária – Doutrina e Prática. Rio de Janeiro: Editora A Noite 1940, 337p.

Bastos J & Napoleão P (orgs). O estado do ambiente: indicadores ambientais do Rio de Janeiro em 2010. Rio de Janeiro: SEA; INEA, 2011. 160p.

Benchimol JL, Silva AFC. Ferrovias, doenças e medicina tropical no Brasil da República. História Ciência e Saúde. Casa de Oswaldo Cruz 2008, 15(3): 719-762.

Bértoli M & Moitinho MLR. Malária no Estado do Paraná, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2001, 34 (1):43-47.

Branquinho MS, Marrelli MT, Curado I, Natal D, Barata JM, Tubaki R, et al. Infection of Anopheles (Kerteszia) cruzii by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* variant VK247 in the municipalities of São Vicente and Jquitiba, São Paulo. Rev Panam Salud Publica 1997, 2: 189-93.

Brasil. Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde. Colaboração de Agostinho Cruz Marques. Manual de Terapêutica da Malária. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. 2001. 104p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico da Malária nº 01/2003.

Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 153. Brasília: Ministério da Saúde, 14 de junho de 2004a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Malária PNCM. 2ª ed. rev- Brasília: Ministério da Saúde, 2004b.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. -Brasília DF: Ministério da Saúde, 2005 112p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 85-334-0974-5.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico da malária nº 06/2006.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2008a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil. Diretoria Técnica de Gestão. - Brasília: Ministério da Saúde, 2008b. 36p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brasil. Ministério do Desenvolvimento Agrário. Secretaria de Agricultura Familiar. Manual Agroflorestal para a Mata Atlântica. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2008c. 196 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2ª ed. Brasília DF: Ministério da Saúde, 2009 116p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1556-0

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2013, vol 44 nº1.

Brasil P, Guaraldo L. Boletim de Farmacovigilância. Unidade de Farmacovigilância do Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria Estadual de Saúde e Defesa Civil do Rio de Janeiro. Nº4. Julho de 2007.

Brasil P, Costa AP, Longo CL, Silva S, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel- Ribeiro CT. Malaria, a difficult diagnosis in a febrile patient with sub-microscopic parasitaemia and polyclonal lymphocyte activation outside the endemic region, in Brazil. *Malaria Journal* 2013, 12:402.

Bressan CS. Estudo das características das principais Doenças Febris Agudas atendidas em Serviço de Referência do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz. [Dissertação de Mestrado] Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Clinicas Evandro Chagas. Fundação Oswaldo Cruz, 2010, 88p.

Brito CF & Ferreira MU. Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, 106 Suppl 1:12-26.

Camargo EP. Malária, Maleita, Paludismo. *Ci Cultura* 2003, 55: 26-32.

Carvalho FF, Rachou RG. Considerações sobre a Malária no estado do Rio de Janeiro com espacial referência ao Vale do Rio Piraí. *Rev Bras Mal D Trop.* 1950, 473-487.

Carvalho ME, Glasser CM, Santos LA, Ciravolo RMC. Nota sobre o encontro de casos autóctones de malária vivax por meio de técnica sorológica, em São Paulo. *Cadernos de Saúde Pública* 1985, 1(2) 250-2.

Carreira-Alves JR. Encontro de anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus* em recipientes artificiais, Maricá, RJ, Brasil. Rev Saúde Pública. 2001; 35(4): 407-8.

Castro MC, Monte-Mor RL, Sawyer DO, Singer BH. Malaria risk on the Amazon Frontier. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103, 2452–2457, 2006.

Cavasini CE, Mattos LC, Couto AARD, Couto VSCD, Gollino Y, Morreti LJ, Bonini-Domingos CR, Rossit ARB, Castilho L, Machado RLD. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. Malaria Journal 2007, 6:167.

Cerávolo, IP. Caracterização imunológica e molecular da Duffy Binding Protein do *Plasmodium vivax* em áreas de transmissão de malária na Região Amazônica e Extra-Amazônica Brasileira. [Tese de Doutorado] Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz, 2007, 132p.

Cerutti Junior C, Boulos M, Coutinho AF, Hatab MCFL, Falqueto A, Rezende HÁ, Duarte AMRC, Collins W, Malafronte RS. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. Malaria Journal 2007a, 6:1-12

Cerutti Junior C. Caracterização epidemiológica da malária autóctone do Espírito Santo. [Tese de Doutorado] São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007, 215p.

Chaves KM, Zumpano JF, Resende MC, Pimenta Junior FG, Rocha MOC. Malária em Minas Gerais, Brasil, no período 1980-1992. Cad. Saúde Públ 1995, 11 (4): 621-623.

Chirenda J & Murugasampillay S. Malaria and HIV co-infection: available evidence, gaps and possible interventions. Cent Afr J Med 2003, 49(5-6):66-71.

Collins WE & Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. Clinical Microbiology 2007, 579-592.

Cormier LA. The historical ecology of human and wild primate malarias in the New World. Diversity 2010,2: 256–280.

Consoli RAGB & Lourenço-de-Oliveira R: Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 1994.

Costa AP, Ferreira MF, Bressan CS, Pedro RS, Valls R, Daniel-Ribeiro CT, Brasil, P. Malária de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro. In 45º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 2009, Recife-PE. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009, v.42. p.477.

Costa AP, Bressan CS, Pedro RS, Valls-de-Souza R, Silva S, Souza PR, Guaraldo L, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, Brasil P. Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic area in the Brazilian extra-Amazon: recente experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop 2010, 43 (Suppl 5):571–574.

Costa C, Lamas I, Fernandes R. Planejamento estratégico do Mosaico Central Fluminense. [acesso em 08 de novembro de 2013.] Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/mosaicos/planejamento-central-fluminense.pdf>

Couto RD. Malária autóctone notificada no Estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos de 1980 a 2007. [Dissertação de Mestrado Profissional] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2008, 49p.

Couto RD, Latorre MRDO, Di Santi SM, Natal D. Malária autóctone notificada no Estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos de 1980 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010, 43(1):52-58.

Cox – Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Conway DJ, Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria humans in widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 2008, 46 (2): 165-71.

Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. *Trends in parasitology* 2003, 19:5.

Cumbane VS. Resposta de anticorpos contra proteínas recombinantes baseadas em antígenos de merozoítos de *Plasmodium vivax* em indivíduos de uma comunidade rural da Amazônia brasileira. [Dissertação de mestrado] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2011, 83p.

Curado I, Duarte AMRC, Lal AA, Nussenzweig RS, Oliveira S, Kloetzel JK. Serological investigation of human *Plasmodium vivax*-like malaria in several localities in the State of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1995, 90: 284.

Curado I, Malafronte RS, Duarte AMR, Kirchgatter K, Branquinho MS, Galati EAB. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Acta Tropica* 2006, 100: 54-62.

Curotto SM, Silva TG, Basso FZ, Barros Filho IR. Malária em mamíferos silvestres. *Arq. Ciênc.Vet. Zool* 2012, v. 15, n. 1, p. 67-77.

Daniel-Ribeiro CT, Guimarães de Lacerda MV, Oliveira-Ferreira J. Paludisme dû à *Plasmodium vivax* en Amazonie brésilienne: quelques aspects de son épidémiologie, de ses manifestations cliniques et des réactions immunitaires naturellement acquises. *Bull Soc Pathol Exot* 2008, 101, 243-248.

Daumas RP, Passou SRL, Oliveira RVC, Nogueira RMR, Georg I, Marzochi KBF, Brasil P. Clinical and laboratory features that discriminate dengue from other febrile illnesses: a diagnostic accuracy study in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13:77.

Deane LM, Okumura M, Ferreira Neto JA, Ferreira MO. Malaria parasites of Brazilian monkeys. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1969, 11:71-86.

Deane LM, Ferreira Neto JA, Deane MP, & Silveira IPS. *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simiunt* and *Plasmodium brasilianum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1970, 64:647.

Deane LM. Malária vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986, 81 (Suppl II):5-14.

Deane LM. Simian malaria in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1992, (87):1-20.

Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, Price RC. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal* 2012, 11:13.

Dover AS & Guinee VF. Malaria transmission by leukocyte component therapy. *Journal of the American Medical Association* 1971, 217:1701-1702.

Duarte AMRC, Porto MAL, Curado I, Malaforte RS, Hoffmann EHE, Oliveira SG, Silva AMJ, Kloetzel JK, Gomes AC. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. *J Med Primatol* 2006, 35: 87–96.

Duarte AMRC, Malaforte RS, Cerruti Jr C, Curado I, Paiva BR, Maeda AY, Yamasaki T, Summa MEL, Neves DVDA, Oliveira SG, Gomes AC. Natural

Plasmodium infections in Brazilian wild monkeys: Reservoirs for human infections? Acta Tropica 2008, Volume 107, 2:179–185.

Duarte AM, Pereira DM, de Paula MB, Fernandes A, Urbinatti PR, Ribeiro AF, Mello MH, Matos MO Jr, Mucci LF, Fernandes LN, Natal D, Malafronte RS. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic Forest in Brazil. Parasit Vectors 2013, 6:58.

Escalante AA, Barrio E & Ayala FJ. Evolutionary origin of human and primate malarial parasites: evidence from the circumsporozoite protein gene. Mol. Biol. Evol 1995, 12, 616-626.

Escalante AA, Cornejo OE, Freeland DE, Poe AC, Durrego E, Collins WE, La AA. A monkey's tale: The origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005, 102(6): 1980–1985.

Ferreira E, Corrêa RR, Tomch A, Teles de Sá F. Estudo sobre o raio de vôo do *Anopheles (kerteszia) cruzii* e do *Anopheles (kerteszia) bellator* em Guaratuba, litoral do estado do Paraná, Brasil. Rev Bras de Malariologia e Doenças tropicais 1969, 819-822.

Ferreira MEMC. Ocorrência de malária na área de influência do reservatório de Itaipu – margem esquerda – Paraná, Brasil. Um estudo de geografia médica. [Tese de Doutorado] São Paulo: Universidade de São Paulo, 1996, 281p.

Fidalgo RF, Santos JV, Rocha JP, Metzger RS, Vicens K, Tanizaki-Fonseca, Bohrer CBA. In Bergallo HG (ed.). Estratégias e ações para a conservação da biodiversidade no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Instituto Biomas. 2009 p. 101–110.

Fortuna JG, Espíndola MAD, Guimarães APM. Educação ambiental: conteúdo disciplinar como prática de preservação do Rio Boa Vista, nas Instituições de ensino do município de Cachoeiras de Macacu, RJ. [Monografia de conclusão de

especialização]. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2002, 87p.

Fundação S.O.S. Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. 2009. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período: 2005–2008. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica. 120 p.

Gaeta GB, Fusco FM, Nardiello S. Fever of unknown origin: a systematic review of the literature for 1995-2004. *Nucl Med Commun* 2006. 27 (3):205-11.

Gama BE. Padronização de reações de polimerização em cadeia (PCRs) convencional e em tempo real gênero-específicas para detecção dos parasitos de malária em indivíduos pauciparasitados. [Dissertação de Mestrado] Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, 2006, 87p.

Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med* 2010, 30: 93-129.

Garfield MD, Ershler WB, Maki DG. Malaria transmission by plaquet concentrate transfusion. *Journal of the American Medical Association* 1978, 240 (21) 2285-2286.

González JM, Hurtado S, Arévalo-Herrera M, Herrera S. Variants of the *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (VK210 and VK247) in Colombian Isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001, 709-712

Gomes AC, Paula MB, Duarte AMRC, Lima MA, Malafronte RS, Gotlieb SLD, Natal D. Epidemiological and ecological aspects related to malaria in the area of influence of the lake at Porto Primavera dam, in western São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2008, 50(5): 287-295.

Gomes AC, Paula MB, Natal D, Gotlieb SLD. Ecologia de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root em área de implantação de empreendimento

hidrelétrico, na divisa dos Estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Soc Bras Med Trop* 2010, 43(3):272-276.

Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends in Parasitology* 2006, 22 (8): 353-358.

Guimarães LO, Bajay MM, Wunderlich G, Bueno MG, Röhe F, Catão-Dias JL, Neves A, Malafronte RS, Curado I, Kirchgatter K. The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. *Acta Tropica* 2012, 124: 27-32.

Guimarães de Lacerda MV. Manifestações clínicas e patogêneses da plaquetopenia na malária. [Tese de Doutorado] Brasília : Universidade de Brasília, 2007, 395p.

Guimarães de Lacerda MV, Mourão MPG, Coelho HCC, Barberino Santos J. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, Vol. 106 (Suppl. I): 52-63.

Hänscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin Lab Haematol* 1999, 21(4): 235-245.

Hastings O, Langermans JAM, Maamun J, Farah IO, Yole DS, Mwenda JM, Weiler H, Thomas AW. Experimental infection of the Olive Baboon (*Papio anubis*) with *Plasmodium knowlesi*: severe disease accompanied by cerebral involvement. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2003, 69(2): 188–194.

Hayakawa K, Ramasamy B, Chandrasekar PH. Fever of unknown origin: an evidence-based review. *Am J Med Sci* 2012, 344(4):307-16.

Hermesen CC, Telgt DS, Linders EH, van de Locht LA, Eling WM, Mensink EJ, Sauerwein RW. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Mol Biochem Parasitol* 2001, 118:247-251.

Jin Y, Kebaier C, Vanderberg J. Direct microscopic quantification of dynamics of *Plasmodium berghei* sporozoite transmission from mosquitoes to mice. *Infect Immun* 2007, 75(11): 5532-9.

Kain KC, Keystone J, Franke ED, Lanar, DE. Global distribution of a variant of circumsporozoite gene of *Plasmodium vivax*. *Journal of Infectious Disease* 1991, 164: 208-210.

Kaya A, Ergul N, Kaya SY, Kilic F, Yilmaz MH, Besirli K, Ozaras R. The management and the diagnosis of fever of unknown origin. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013, (8):805-15.

King CL, Adams JH, Xianli J, Grimberg BT, McHenry AM, Greenberg LJ, Siddiqui A, Howes RE, Silva-Nunes M, Ferreira MU, Zimmerman PA. Fya/Fyb antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. *PNAS* 2011, 108: 20113–20118

Kirchgatter K, Nogueira SL, Padilha A, Curado I, Boulos M, Di Santi SM. Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an asplenic patient in Brazil. *BMJ* 2005, 331: 576-b.

Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, Goroti M, Sie A , Oa O, Genton B, Beck HP, Ingrid Felger I. Evaluation of *Plasmodium vivax* Genotyping Markers for Molecular Monitoring in Clinical Trials. *J Infec Dis* 2009, 199:1074 – 80.

Kow-Tong C, Chein-Jen C, Po-Ya C, Dale LM. A Nosocomial Outbreak Of Malaria Associated with Contaminated Catheters and Contrast Medium of a Computed Tomographic Scanner. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999, 20:22-25.

Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW,

Killick-Kendrick R, Wolf R, Sinden R, Koontz LC, Stanfill PS. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1982, 31(6): 1291-3.

Laporta GZ, Ramos DG, Milton Cezar Ribeiro MC, Sallum MAM. Habitat suitability of *Anopheles* vector species and association with human malaria in the Atlantic Forest in south-eastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, 106 (Suppl. I): 239-245.

Lee MA, Tan CH, Aw LT, Tang CS, Singh M, Lee SH, Chia HP, Yap EP. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *J Clin Microbiol* 2002, 40:4343-4345.

Lim CS, Tazi L, Ayala FJ. *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 25:102 (43):15523-8.

Lima GFMC. Análise comparativa da PCR em tempo real, nested PCR e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em *pool*, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala. [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011, 144p.

Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, Ndjanga JBN, Sanz CM, Morgan DB, Locatelli S, Gonder MK, Kranzusch PJ, Walsh PD, Delaporte E, Mpoudi-Ngole E, Georgiev AV, Muller MN, Shaw GM, Peeters M, Sharp PM, Rayner JC, Hahn BH. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature* 2010, 23: 467(7314): 420–425.

Lorenz C, Marques TC, Sallum MA, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasit Vectors* 2012, 5:257.

Lourenço-de-Oliveira R & Deane LM. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. The infection rates of *Plasmodium brasilianum* in non-human primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995, 90: 331-339.

Machado RLD & Póvoa MM. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of Amazonian Brazil and their correlation with chloroquine-treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, 94:377-381.

Machado RLD, D'Almeida Couto AAR, Cavasini CE, Calvosa VSP. Malaria outside the Brazilian Amazonian region: the situation in Santa Catarina State. *Rev da Soc Bras Med Trop* 2003, 36(5): 581-586.

Machado RLD, Figueriredo-Filho AF, Calvosa VSP, Nascimento JM, Póvoa MM. Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitemia. *J Infec Dis* 2003, 7:175-177.

Marques GRMS, Condino MLF, Serpa LLN, Cursino TVM. Aspectos epidemiológicos de malária autóctone na Mata atlântica, litoral norte, Estado de São Paulo, 1985-2006. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008, 41(4): 386-389.

Martin-Blondel G, Barry M, Porte L, Busato F, Massip P, Benoit-Vical F, Berry A, Marchou B. Impact of HIV infection on malaria in adults. *Med Mal Infect.* 2007, 37(10):629-36.

Marrelli MT, Malafrente RS, Sallum MAM, Natal D. *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. *Malaria Journal* 2007, 6: 127.

Maselli LMF, Levy D, Laporta GZ, Monteiro AM, Fukuya LA, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, Dorlhiac-Llacer PE, Sallum MAM, Bydlowski SP. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* subclinical infection in non-endemic region: implications for blood transfusion and malaria epidemiology. *Malaria Journal* 2014, **13**:224.

Mattos MS, Oliveira-Ferreira J, Castro MG, Lourenço-de-Oliveira R. Malária autóctone no município de Nova Friburgo- Rio de Janeiro. In: IV Reunião Nacional dos Pesquisadores em Malária. Manaus. 1993; 23.

McDermott JM, Wirima JJ, Steketee RW. The effect of placental malaria infection on perinatal mortality in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 1996, 55 (1) 161-65.

Miguel RB. Estudo da infecção humana por *Plasmodium* spp no município de Guapimirim, estado do Rio de Janeiro. [Dissertação de Mestrado] Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz; 2011, 145p.

Moraes HF. SUCAM sua origem sua história. 2ª ed. Brasília. 1990; 484p.

Mota T. Casos de malária caem 45% e Minas recebe teste rápido para diagnóstico. [acesso em 05 de fevereiro de 2014.] Disponível em: <http://www.hojeemdia.com.br/minas/casos-de-malaria-caem-45-e-minas-recebe-teste-rapido-para-diagnostico-1.132526>.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000, 403: 853-858.

Neves A, Urbinatti PR, Malafronte RS, Fernandes A, Paganini WS, Natal D. Malaria outside the Amazon region: natural *Plasmodium* infection in anophelines collected near an indigenous village in the Vale do Rio Branco, Itanhaem, SP, Brazil. *Acta Trop* 2013, 125: 102-106.

Oliveira, ABM. Comportamento de bugios (*Alouatta clamitans* Cabrera, 1940) na Ilha Grande, RJ. [Dissertação de Mestrado]. Universidade do Estado do Rio de Janeiro 2011,81p.

Oliveira DM. Em busca da autenticidade: Construções de experiência religiosa na Igreja daimista Flor da Montanha, de Lumiar, Nova Friburgo, RJ. Niterói [Dissertação de Mestrado]. Niterói: Universidade Federal Fluminense 2010, 156p.

Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Teva A, Deane LM, Daniel-Ribeiro CT. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1990, 43(1):6-10.

Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Arruda M, Santos F, Daniel-Ribeiro CT, Golberg AC, Banic DM. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Tropica* 2004, 92 : 63–69

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal* 2010, 9:115.

Olson SH, Gangnon R, Silveira GA, Patz JA. Deforestation and malaria in Mâncio Lima, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2010,16: 1108 -1115.

OptiMAL-IT Malária Test Kit, 2011. Indicações de como realizar o teste. [acesso em 01 de março de 2014]. Disponível em: http://www.tcsbiosciences.co.uk/downloads/OptiMAL-IT_Diagrams_2011.pdf

Organização Mundial de Saúde – (OMS). World Health Organization (WHO). Classificação dos casos de malária. Genebra, 1961 (WHO/PA/164.61).

Organização Mundial de Saúde – (OMS). World Health Organization (WHO). Guidelines on the elimination of residual foci of malaria transmission. Genebra, 2007, 49p. ISBN: 978-92-9021-576-9.

Organização Mundial de Saúde – (OMS). World Health Organization (WHO). Malária [acesso em 15 de junho de 2010.] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>

Organização Mundial de Saúde – (OMS). World Health Organization (WHO). Malária [acesso em 08 de maio de 2011.] Disponível em: <http://rbm.who.int/worldmaliaday/background.html>

Organização Mundial de Saúde – (OMS). World Health Organization (WHO). World malaria report: 2012, 195p. Disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.html

Park CG, Chwae YJ, Kim JI, Lee JH, Hur GM, Jeon M, Koh BH, Han JS, Lee H, Kaslow DC, Rickman ST, Roh CS. Serologic responses of korean soldiers serving in malaria-endemic areas during a recent outbreak of *Plasmodium vivax*. American Journal Tropical Medicine and Hygiene 2000, 96:720 – 725.

Pereira-da-Silva LH & Oliveira VEG. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. Ciência & Saúde Coletiva 2002, 7 (1): 49-63.

Reitz R. “Bromeliáceas e a malária—bromélia endêmica,” in Flora Ilustrada Catarinense. Parte I. Fascículo Bromélia, 1983.

Rezende AM, Tarazona-Santos E, Fontes CJF, Souza JM, Couto ADA, Carvalho LH, Brito CFA. Microsatellite loci: determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. Tropical Medicine and International 2010, 15, 6: 718–726.

Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. The Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. Biol Conserv 2009, 142: 1141-1153.

Rodrigues PT. Genomas mitocondriais de *Plasmodium vivax* e a origem geográfica da malária importante. [Dissertação de Mestrado] São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012, 104p.

Rona LDP, Carvalho-Pinto CJ, Gentile C, Grisard EC, Peixoto AA. Assessing the molecular divergence between *Anopheles (Kerteszia) cruzii* populations from Brazil using the timeless gene: further evidence of a species complex. *Malaria Journal* 2009, **8**:60.

Rona LDP, Carvalho-Pinto CJ, Peixoto AA. Molecular evidence for the occurrence of a new sibling species within the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex in south-east Brazil. *Malaria Journal* 2010, **9**:33.

Rosa-Feitas M, Lourenço-De-Oliveira R, Carvalho-Pinto J, Flores-Mendosa C, Silva-Do-Nascimento T. *Anopheline species* complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1998, 93(5): 651-655.

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

Saez-Alquézar A, Ramos AMSV, Di Santi SM, Branquinho MS, Kirchgatter K, Cordeiro IAC. Controle da malária transfusional em região endêmica e não endêmica do Brasil. *Rev da Soc Bras Med Trop* 1998, 31(1): 27-34.

Sallum MAM, Urbinatti PR, Malafronte RS, Resende HR, Cerutti Jr C, Natal D. Primeiro registro de *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (Diptera, Culicidae) no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 2008, 52(4): 671-673.

Sanchez BAM. Caracterização do receptor DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines) e da resposta imune anti Duffy Binding Protein em indivíduos

expostos ao *Plasmodium vivax*. [Tese de Doutorado] Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz, 2011, 165p.

Scuracchio P, Vieira, SD, Dourado DA, Bueno LM, Colella R, Ramos-Sanchez EM, Lima GC, Inoue J, Sanchez MCA, Di Santi SM. Transfusion-transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 2011, 53(1): 55-9.

Shin Shiang LO, Andrade JCR, Condino MLF, Alves MJCP, Semeghini MG, Galvão EC. Malária em usuários de drogas de administração endovenosa associada à soropositividade para HIV. Rev Saúde Pública 1991, vol.25, n.1, pp. 17-22.

Singh B, Cox-Singh J. *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? Trends in Parasitology 2008, vol 24, nº9, 406-410.

Snounou G & Singh B. Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. Methods Mol Med 2002, 72:189-203.

Snounou G, Viriyakosol, S, Jarra W, Thaitong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction of high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol 1993, 58:283-292.

Sousa TN, Sanchez BAM, Cerávolo IP, Carvalho LH, Brito CFA. Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor. Vox Sanguinis 2007, 92: 373–380.

Souza-Neiras WC, Storti-Melo LM, Cassiano GC, Couto VSCA, Couto AARA, Soares IS, Carvalho LH, Cunha MG, Herrera S, Herrera MA, Rossit ARB, Carareto CMA, Machado RLD. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences? Malaria Journal 2010, 9:178

Speers DJ, Ryan S, Harnett G, Childlow G. Diagnosis of malaria aided by polymerase chain reaction in two cases with low parasitemia. *Int Med J* 2003, 33: 613-615.

Storti-Melo LM, Souza-Neiras WC, Cassiano GC, Joazeiro ACP, Fontes CJ, Bonini-Domingos CR, D'Almeida Couto AAR, Povia MM, Mattos LC, Cavasini CE, Rossit ARB, Machado RLD. *Plasmodium vivax* circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009,103: 672-678.

Suárez-Mutis MC, Martinez-Espinosa FE, Albuquerque BC. Malária. In Coura, José Rodrigues. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005 2v.p. 833-58.

Suárez-Mutis MC & Coura JR. Evaluation of the thick smear in a field condition in a malaria endemic area in the middle region of Rio Negro, Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006, 39:495-497.

Suárez-Mutis MC & Coura JR Changes in the epidemiological pattern of malaria in a rural area of the middle Rio Negro, Brazilian Amazon: a retrospective analysis. *Cad Saúde Pública* 2007a 23: 795-804.

Suárez-Mutis MC, Cuervo P, Leoratti F, Ávila S, Ferreira W, Fernandes O et al. Cross-sectional study reveals asymptomatic *Plasmodium* infection at Rio Negro area, Brazilian Amazon. *Staté. Rev Inst Med Trop São Paulo* 2007b, 49:159-164.

Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malaria Journal* 2014, 13:68.

Torres KL, Figueiredo DV, Zalis MG, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim W, Ferreira-da-Cruz MF. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for

detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. *Parasitol Res.* 2006, 98: 519-524.

Torres-Silva KL. Padronização de uma reação de polimerização em cadeia (PCR) para o diagnóstico da malária por *Plasmodium vivax*. [Dissertação de Mestrado] Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1999, 94 p.

Ueno HM, Forattini OP, Kakitani I. Vertical and seasonal distribution of *Anopheles (Kerteszia)* in Ilha Comprida, Southeastern Brazil. *Rev Saúde Pública* 2007, 41(2):269-75.

Veltri AC, Bezerra IO, Moza PG, Porto SS, Hoelz MPC, Araújo LD, Miller ALF, Lopes ACF, Lopes MS. Malária autóctone na localidade de Lumiar - município de Nova Friburgo - Estado do Rio de Janeiro de 2007 a 2010. In XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2011, Natal-RN, p.89.

Vittor AY, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Lozano WS, Pinedo-Cancino V, Patz JA. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of *Falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2006, 74: 3-11.

Zalis MG, Ferreira-Da-Cruz MF, Balthazar-Guedes HC, Banic DM, Alecrim W, Souza JM et al. Malaria diagnosis: standardization of a polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low-grade parasitemia. *Parasitol Res* 1996, 82: 612.

Yamasaki T. Detecção dos agentes da malária simiana resgatados em regiões de Mata Atlântica de São Paulo. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 2011, 104p.

Yamasaki T, Duarte AM, Curado I, Summa ME, Neves DV, Wunderlich G, Malafronte RS. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *J Med Primatol* 2011a, 40(6):392-400.

Wanderley DMV, Andrade JCR, Alves MJCP, Alves MCGP, Mattos MR, Gurgel SM, et al. Malária no Estado de São Paulo: avaliação de aspectos da vigilância epidemiológica. *Cad Saúde Pública* 1989, 5:296-304.

Warrell DA & Gilles HM. *Essential malariology 2002*, 4th ed. London: Arnold.

Wells S & Ala FA. Malaria and blood transfusion. *Lancet* 1985, 8: 1317-1318.

ANEXOS

ANEXO 1

Questionário padrão utilizado no atendimento aos indivíduos com febre

2797030031



FIOCRUZ

Código/BE

[Grid for Código/BE]

Nome

[Grid for Nome]

Data de Nascimento

[Grid for Data de Nascimento]

Nat

[Grid for Nat]

Sexo

1 M 2 F

Nome da Mãe

[Grid for Nome da Mãe]

Endereço Residência

[Grid for Endereço Residência]

Bairro

[Grid for Bairro]

Tempo de residência
(em anos)

[Grid for Tempo de residência]

Localidade

1 Rural 2 Urbana

Cidade

[Grid for Cidade]

Estado

[Grid for Estado]

Telefone

[Grid for Telefone]

Telefone contato

[Grid for Telefone contato]

Ocupação

[Grid for Ocupação]

Bairro de Trabalho

[Grid for Bairro de Trabalho]

Dados epidemiológicos (últimos 30 dias)

Viagem Recente

1 Sim 2 Não

Data da viagem

[Grid for Data da viagem]

Local

[Grid for Local]

Casos semelhantes

1 Sim 2 Não

Casa

1 Sim 2 Não

Vizinho

1 Sim 2 Não

Trabalho

1 Sim 2 Não

Exposição Enchente

1 Sim 2 Não

Limpeza de locais c/ ratos

1 Sim 2 Não

Contato com aves

1 Sim 2 Não

Entrada em vala negra

1 Sim 2 Não

Área de Malária

Último 3 meses

1 Sim 2 Não

Ingestão de peixe cru

1 Sim 2 Não

Entrada em cavernas

1 Sim 2 Não

Contato c/carrapatos

1 Sim 2 Não

Ingestão de leite cru

1 Sim 2 Não

Limpeza de Esgotos/Fossa

1 Sim 2 Não

Contato com animais doentes

1 Sim 2 Não

Ingestão de Açai

1 Sim 2 Não

Limpeza de caixa D'água

1 Sim 2 Não

Contato com Caramujo

1 Sim 2 Não

Abastecimento de água:

1 Rede geral 2 Poço/Nascente

3 Outra

Tratamento da água de beber:

1 não 2 clora/filtra/ferve

3 água mineral

Hemotransusão

1 Sim 2 Não

5323030039

Cod

--	--	--	--

Prostração <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Mialgia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Lombalgia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Artralgia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Anorexia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3		
Náuseas <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Vômitos <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Dor Abdominal <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Colúria <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> Não	Disúria <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> Não		
Diarréia <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Nº de evacuações / Dia <table style="display: inline-table; border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; margin-right: 5px;"></table> <table style="display: inline-table; border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; margin-right: 5px;"></table> <table style="display: inline-table; border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></table>			Sangue <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Muco <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Dispnéia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3
Tosse <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Tosse Produtiva <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Hemorragias <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não		Epistaxe <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Gengivorragia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	
Metrorragia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Hematúria <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Hematêmese <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Melena <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Prurido <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3		
Hemoptóicos / Hemoptise <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3		Lipotímia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Exantema <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Convulsões <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3		

7663030038

Exame Físico :

Cod

--	--	--	--

Data do primeiro atendimento

Data 2º Atendimento

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Assinale 0 - Ausente / 1 - Leve / 2 - Moderado / 3 - Grave ou Sim Não, exceto quando a resposta for numérica (Temp ax, PA, etc)

Temp Ax(°c) <input type="text"/> <input type="text"/> ,	Temp Ax(°c) <input type="text"/> <input type="text"/> ,	PA sentada <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>	PA <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
Freq. cardíaca <input type="text"/> <input type="text"/>	Freq. cardíaca <input type="text"/> <input type="text"/>	PA deitada <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>	PA <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
Freq. Respiratória <input type="text"/> <input type="text"/>	Freq. Respiratória <input type="text"/> <input type="text"/>	Enchimento capilar lentificado <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Pulso filiforme <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não

Extremidades frias <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Hipotensão/Choque <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Dispnéia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Desidratação <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3
Palidez cutânea mucosa <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Edemas <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Congestão ocular <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Icterícia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3
Exantema <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Macular <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Maculo-papular <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Vesiculoso <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não
Enantema <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Hiper orofaringe <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Adenomegalias <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Cadeias ganglionares <input type="checkbox"/> 1 cervical <input type="checkbox"/> 2 occipital <input type="checkbox"/> 3 supraclavicular <input type="checkbox"/> 4 axilar <input type="checkbox"/> 5 epitrocLEAR <input type="checkbox"/> 6 inguinal <input type="checkbox"/> 9 NSA
Hemorragias <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Petéquias <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Púrpura <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Gengivorragia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3

2629030035

Cod

--	--	--	--

Hepatomegalia <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Dor percussão lombar unilateral <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 2 Não	Esplenomegalia <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Ascite <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3
Dor abdominal à palpação <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Rigidez de nuca <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Estertores <input type="checkbox"/> 0 Ausente <input type="checkbox"/> 1 Unilateral <input type="checkbox"/> 2 Unilateral difuso <input type="checkbox"/> 3 Bilateral	Roncos <input type="checkbox"/> 0 Ausente <input type="checkbox"/> 1 Unilateral <input type="checkbox"/> 2 Unilateral difuso <input type="checkbox"/> 3 Bilateral
Sibilos <input type="checkbox"/> 1 Ausente <input type="checkbox"/> 2 Unilateral <input type="checkbox"/> 3 Unilateral difuso <input type="checkbox"/> 4 Bilateral	Sopro Cardíaco <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 3	Alterações Radiológicas <input type="checkbox"/> 1 Condensação alveolar <input type="checkbox"/> 2 Infiltrado intersticial <input type="checkbox"/> 3 Derrame pleural <input type="checkbox"/> 4 Outros <input type="checkbox"/> 5 aumento de área cardíaca	

Diagnóstico

Diagnóstico Clínico

- 1 Dengue
- 2 Rubéola
- 3 Sarampo
- 4 Parvovirus B19
- 5 Mononucleose
- 6 Infec. aguda HIV
- 7 Varicela
- 8 Citomegalovírus
- 9 Enterovírus
- 10 Meningococemia
- 11 Rickettsioses
- 12 Leptospirose
- 13 Febre amarela
- 14 Hepatites
- 15 Malária
- 16 Adenovírus
- 17 Rinovírus
- 18 meningites
- 19 Influenza
- 20 para-Influenza
- 21 USR
- 22 Outros

Diagnóstico por Síndromes

- 1 Exantemática
- 2 Linfadenogálica
- 3 Hemorrágica
- 4 Ictérica
- 5 Respiratória
- 6 Neurológica
- 7 Febril
- 8 Diarreica
- 9 Missing

IGM

- 1 Positivo
- 2 Negativo

IGM-2

- 1 Positivo
- 2 Negativo

Isolamento

- 1 Positivo
- 2 Negativo

9390030037

Cod

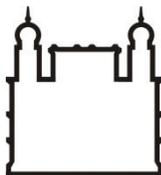
□□□□

Tabela II-Exame

Laboratório										Laboratório																																		
□□□□□□□□□□										□□□□□□□□□□																																		
Data Exame					Data Exame					Data Exame					Data Exame																													
□□		/		□□		/		□□		□□		/		□□		/		□□		□□		/		□□		/		□□																
Htc%					Plaq. (x10 ³)					Htc%					Plaq. (x10 ³)					Htc%					Plaq. (x10 ³)																			
□□		,		□		□□□		□□□		□□		,		□		□□□		□□□		□□		,		□		□□□		□□□		□□														
Hb					Leucócitos					Hb					Leucócitos					Hb					Leucócitos																			
□□□□		,		□		□□□□□□		□□□□□□		□□□□		,		□		□□□□□□		□□□□□□		□□□□		,		□		□□□□□□		□□□□□□		□□□□□□														
Bas			Eos			Jovens			Bas			Eos			Jovens			Bas			Eos			Jovens			Bas			Eos			Jovens											
□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□												
Bast			Seg			Linf			Monócito			Atípico			Bast			Seg			Linf			Monócito			Atípico			Bast			Seg			Linf			Monócito			Atípico		
□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□		□□						
Tgo					Tgp					Tgo					Tgp					Tgo					Tgp																			
□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□										
Albumina					FA					Albumina					FA					Albumina					FA																			
□		,		□		□□□		□□□		□		,		□		□□□		□□□		□		,		□		□□□		□□□		□□□		□□□												
TAP (%)					BbD					TAP (%)					BbD					TAP (%)					BbD																			
□□		,		□		□□		,		□		□□		,		□		□□		,		□		□□		,		□		□□		,		□										
BbT					Gama GT					BbT					Gama GT					BbT					Gama GT																			
□□		,		□		□□□		□□□		□□		,		□		□□□		□□□		□□		,		□		□□□		□□□		□□□		□□□												
Ureia					Sódio					Ureia					Sódio					Ureia					Sódio																			
□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□												
Creat					VHS					Creat					VHS					Creat					VHS																			
□□		,		□		□□□		□□□		□□		,		□		□□□		□□□		□□		,		□		□□□		□□□		□□□		□□□												
Amilase					Glicose					Amilase					Glicose					Amilase					Glicose																			
□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□		□□□												
K+					Creat					K+					Creat					K+					Creat																			
□		,		□		□□		,		□		□□		,		□		□□		,		□		□□		,		□		□□		,		□										

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz – **FIOCRUZ**
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/ **IPEC**
Instituto Oswaldo Cruz/**IOC**

**Titulo oficial do Projeto: INVESTIGAÇÃO DOS CASOS DE MALÁRIA AUTÓCTONE
NA MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Investigador principal: Dr^a. PATRÍCIA BRASIL (IPEC)
Estudante de Doutorado: ANIELLE DE PINA COSTA (IPEC)

Colaboradores: Dr. Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro, Dr^a Maria de Fátima Ferreira-da-Cruz e Dr^a Lilian Pratt Riccio, Cesare Bianco Júnior – CPD-Mal (Centro de Pesquisa, Diagnóstico e treinamento em Malária), **Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, Dr^a Teresa Fernandes Silva do Nascimento, Roberto Costa Peres, Dr^a Martha Cecília Suarez Mutis, Renata Bortolasse Miguel (IOC/Fiocruz), Sidnei da Silva** - Laboratório de Parasitologia do IPEC, **Cecília L. Longo e Carolina Romero Cardoso Machado, Renata Saraiva Pedro** - Ambulatório de Doenças Febris Agudas/IPEC.

Endereço: **Serviço de Vigilância em Saúde**
Av. Brasil nº 4365, Manguinhos – Rio de Janeiro – RJ CEP 21.045-900
Telefones: 21-3865 8145 / 3865 8185 / 21- 2562-1278
Celular da Malária – 24h – **21- 99880113**
Fax: 21-3865-8145



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
FIOCRUZ

Eu, _____ fui informado de que a finalidade desta pesquisa é verificar se sou portador do parasita da malária ou se tenho algum sintoma que possa estar relacionado à doença. A malária é uma doença infecciosa, febril aguda, de evolução potencialmente complicada se não tratada adequadamente. A minha participação consistirá em entrevista direcionada através de questionário e coleta de sangue. Responderei a um questionário com perguntas feitas por um dos membros da equipe da pesquisa para obter informações sobre meus dados pessoais, da localidade onde vivo, trabalho e/ou círculo e sobre as minhas condições de saúde no momento da entrevista. O procedimento de coleta de sangue será o seguinte: um volume de 15ml de sangue será retirado de uma veia de um dos meus braços, podendo em algum outro momento da pesquisa a coleta de sangue ser repetida. A retirada do meu sangue poderá ser feita por um enfermeiro, biólogo, médico, farmacêutico ou qualquer outro membro da equipe de investigadores. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor e/ou hematoma (rouxidão) no local da retirada com duração de 3 a 4 dias. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para a limpeza local. Até o momento, não foram identificados riscos quanto aos procedimentos de coleta. Todo o material coletado (sangue, soro e plasma) será estocado e os meus dados pessoais (nome, sexo, idade, endereço e etc) e epidemiológicos (história de viagens recentes, antecedentes clínicos e etc) serão utilizados somente neste projeto podendo vir a ser utilizados também em pesquisas futuras, desde que seja aprovado por Comitê de Ética, e seja resguardada a minha privacidade. As amostras biológicas e os dados do questionário ficarão sob responsabilidade do Ambulatório de Doenças Febris Agudas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas e do Laboratório de Pesquisas em Malária do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Caso o resultado do exame seja positivo, imediatamente será instituído o tratamento gratuito de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde. O mesmo será instituído sob responsabilidade do Ambulatório de Doenças Febris Agudas. A minha participação neste estudo é inteiramente voluntária e poderei me recusar a participar ou me retirar em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo em meu tratamento caso seja identificada malária em minha amostra de sangue. Também poderei desistir ou retirar o meu consentimento da guarda e utilização de minha amostra de sangue em qualquer fase da pesquisa. O resultado desse e de estudos futuros, se por mim solicitados, serão relatados a mim e considerados confidenciais, podendo ser divulgados na forma de comunicação científica. O pesquisador responsável ou alguém de sua equipe colocou-me a par dessas informações estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas. Também tenho total liberdade para contactar os demais pesquisadores envolvidos neste estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento, e pelo presente consinto voluntariamente em participar no estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha presença.

Assinatura: _____ RG: _____

Pesquisador: _____ Data: _____

Fundação Oswaldo Cruz
FIOCRUZ
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC
Serviço de Vigilância em Saúde
Endereço: Av. Brasil nº 4365, Manguinhos – Rio de Janeiro – RJ CEP 21.045-900
Telefones: 21-3865 8145 / 3865 8185 / 21- 2562-1278
Celular da Malária – 24h – 21- 99880113
Fax: 21-3865-8145

ANEXO III



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

Ambulatório de Doenças Febris

Agudas

Serviço de Vigilância em Saúde/IPEC

Laboratório de Doenças Parasitárias/IOC

Centro de Pesquisa Diagnóstico e Treinamento em Malária CPD-Mal/IOC

ASPECTOS ETIOLÓGICOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA MALÁRIA DE MATA ATLÂNTICA DO RIO DE JANEIRO

Data: / /	Pesquisador:
-------------------------	--------------

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome:		
Nome da Mãe:		
Data Nascimento: / /	Idade:	Sexo: () F () M
Cor: () 1-branca/ () 2- preta/ () 3- amarela/ () 4- parda/ () 5- índio		
Local de nascimento:		
Grau de Instrução: () analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto () 2º grau completo () 3º grau incompleto () 3º grau completo () mestrado () doutorado		
Atividade de trabalho: Profissão: Ocupação:		
Local de trabalho:		() Rural () Urbana
Endereço do trabalho:		
Endereço atual:		
Bairro:		
Ponto de Referência:		
Localidade		
Tempo de residência no Local:		
Telefones:		
Email:		

2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

<input type="checkbox"/> Morador <input type="checkbox"/> Visitante	Freqüência com que visita o local:
Já viajou para fora do estado do RJ: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI Local:	
Já viajou para área endêmica de malária: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI Já viajou para Amazônia: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI Quando: _____ Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e <u>Mato Grosso, Maranhão, Tocantins.</u> Já viajou para África: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI Quando: _____ Já viajou para Ásia: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI Quando: _____ Já viajou para América Central: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI Quando: _____ Local:	
Histórico de deslocamentos para área de transmissão de malária nos últimos 3 meses?	
Local	Período da viagem
Observações:	
Conhece alguém que tenha adquirido malária nos últimos 3 meses? () 1. Sim () 2. Não () 9. SI () Casa () Vizinhança () Trabalho () Escola () Outros Local provável de transmissão: _____ _____	

CONHECIMENTOS GERAIS

Costuma freqüentar a área de mata fechada? () 1. Sim () 2. Não () 9. SI
Tem bromélias na região? () 1. Sim () 2. Não () 9. SI
Há macacos na região? () 1. Sim () 2. Não () 9. SI

Mora ou freqüenta a seita do Santo Daime? ()1. Sim () 2. Não () 9. SI
Pratica caça em área de mata? ()1. Sim () 2. Não () 9. SI
Tem hábito de tomar banho de rio? ()1. Sim () 2. Não () 9. SI
Mora ou trabalha perto de madeireira? Sabe de onde vem a madeira? ()1. Sim () 2. Não () 9. SI Observações:

3. HISTÓRIA PREGRESSA DE MALÁRIA

Já teve malária: ()1. Sim () 2. Não () 9. SI	
Nº Infecções anteriores de malária: _____	Data da infecção anterior: / /
Infecção anterior: () 1. <i>P. falciparum</i> () 2. <i>P. vivax</i> () 3. <i>P. malariae</i> () 4. <i>Pf + Pv</i> () 9. SI	
Tratou: ()1. Sim () 2. Não () 9. SI	Local:
Já teve malária no domicílio atual: ()1. Sim () 2. Não () 9. SI	
ÚLTIMO TRATAMENTO MEDICAMENTOSO:	
Início do tratamento:	Tempo de monitoramento:
Fármacos:	
4. HISTÓRIA CLÍNICA	
Transplante de órgãos: ()1. Sim () 2. Não () 9. SI Quando: / / Local:	
Transfusão sanguínea: ()1. Sim () 2. Não () 9. SI Quando: / / Local: Nº de bolsas:	
Doador de sangue: ()1. Sim () 2. Não () 9. SI Freqüência:	Local:
Gestante: ()1. Sim () 2. Não () 9. SI	Idade Gestacional (semanas):
Anemia Falciforme: ()1. Sim () 2. Não () 9. SI	
Acidente com material pérfuro-cortante ()1. Sim () 2. Não () 9. SI	
Faz uso compartilhado de seringas: ()1. Sim () 2. Não () 9. SI	
Faz uso de algum medicamento com freqüência ()1. Sim () 2. Não () 9. SI	

Enumerar os medicamentos de possível ação antimalárica:

() Doxiciclina () Cloroquina () Primaquina () Pirimetamina
 () Sulfas () Outros

Observações:

SI = Sem informação - não sabe a resposta

5. DADOS CLÍNICOS ATUAIS

Sintomas nos últimos 30 dias: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI			
Teve febre nos últimos 30 dias? () 1. Sim () 2. Não () 9. SI			
Data dos 1 ^{os} sintomas:		Primeiro sintoma:	
Procurou atendimento médico () 1. Sim () 2. Não () 9. SI		Local	
Data do 1º atendimento médico:		Local:	
Tempo de duração dos sintomas:			
Desaparecimento dos sintomas:			
Recebeu diagnóstico clínico de dengue: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI			
Recebeu diagnóstico clínico de outra doença: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI			
Usou algum medicamento? () 1. Sim () 2. Não () 9. SI			
Qual:			
Pensou em malária: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI			
SINTOMAS NO MOMENTO DA ENTREVISTA:			
Alguns sintomas neste momento: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI			
Qual:			
<u>FEBRE</u>	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / /	
	Periodicidade:	Aferida: () 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Maior Tº aferida:
<u>Calafrios</u>	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / /	
	Periodicidade:	Último episódio: / /	
<u>Sudorese</u>	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / /	
	Periodicidade:	Último episódio: / /	
<u>Cefaléia</u>	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / /	
	Periodicidade:	Último episódio: / /	

Dor abdominal	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / /
Náuseas	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / / Último episódio: / /
Vômitos	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / / Último episódio: / /
Diarréia	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / / Último episódio: / /
Prostração	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / / Último episódio: / /
Lombalgia	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / / Último episódio: / /
Mialgia	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / / Último episódio: / /
Artralgia	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / / Último episódio: / /
Anorexia	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / /
Fotofobia	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / /
Dor retroorbital	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / /
Sangramentos	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI Local do sangramento:	Data de início / /
Alteração de Paladar	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Data de início / /
Algum outro sintoma:		
EXAME FÍSICO (caso sintomático)		
Temperatura:	Freq Cardíaca	
Freq Respiratória	Palidez Cutânea () 1. Sim () 2. Não () 9. SI	
PA sentado:	PA deitado	
Hepatomegalia () 1. Sim () 2. Não () 9. SI		
Esplenomegalia () 1. Sim () 2. Não () 9. SI		
Icterícia () 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Edema () 1. Sim () 2. Não () 9. SI	
Dispnéia () 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Desidratação () 1. Sim () 2. Não () 9. SI	
Petéquias () 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Exantema () 1. Sim () 2. Não () 9. SI	

Observações:			
MATERIAL COLETADO			
PCR	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Sorologia	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI
	Resultado:		Resultado:
Gota Espessa	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI	Distensão Sanguínea	() 1. Sim () 2. Não () 9. SI
	Resultado:		Resultado:
Observações			