

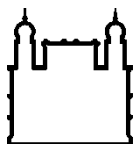
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA
AUTÓCTONE E IMPORTADA NO ESTADO DE RORAIMA**

JAIME LOUZADA

Rio de Janeiro
Setembro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JAIME LOUZADA

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA
AUTÓCTONE E IMPORTADA NO ESTADO DE RORAIMA**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira

RIO DE JANEIRO

Setembro, 2020

Louzada, Jaime.

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA AUTÓCTONE E IMPORTADA NO ESTADO DE RORAIMA / Jaime Louzada. - Rio de Janeiro, 2020.

143 f.; il.

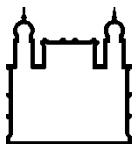
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientadora: Joseli de Oliveira Ferreira.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. malária. 2. Roraima. 3. fronteira. 4. soroprevalência. 5. espacialidade.
I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: JAIME LOUZADA

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA
AUTÓCTONE E IMPORTADA NO ESTADO DE RORAIMA**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira

Aprovada em: 28/09/2020

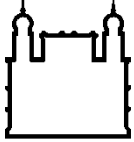
EXAMINADORES:

Prof. Dra. Teresa Fernandes Silva do Nascimento Presidente (Fiocruz)

Prof. Dra. Graziela Maria Zanini (Fiocruz)

Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado (UFF)

Rio de Janeiro, 28 de setembro de, 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

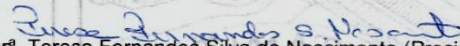
Fundação Oswaldo Cruz

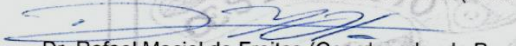


Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de Jaime Louzada, sob orientação da Dr^a. Joseli de Oliveira Ferreira. Ao vigésimo oitavo dia do mês de setembro de dois mil e vinte, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado intitulada: **“CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA AUTÓCTONE E IMPORTADA NO ESTADO DE RORAIMA”**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Ecologia e Epidemiologia, na linha de pesquisa: Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias e Hospedeiros.. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Teresa Fernandes Silva do Nascimento – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Graziela Maria Zanini – INI/FIOCRUZ, Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado – UFF/RJ e como suplentes: Dr^a. Jackeline da Costa Maciel - UFRR/RR e Dr^a. Anielle de Pina Costa - INI/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 28 de setembro de 2020.


Dr^a. Teresa Fernandes Silva do Nascimento (Presidente da Banca)


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Dr^a. Teresa Fernandes Silva do Nascimento
Chefe do Lab. Transmissores de Hematozoários
IOC/FIOCRUZ
Mat. 0964916

Agradecimentos

À minha orientadora “Lila”, Dra. Joseli de Oliveira Ferreira, por me guiar nos caminhos sinuosos durante o trabalho de campo, nas atividades de laboratório e nas encruzilhadas que a vida nos apresentou nessa jornada.

Aos pesquisadores do CDC- Atlanta, em especial, Naomi, Kumar e Luciana

Aos profissionais que trabalham no controle da malária em Pacaraima, Boa Vista, São João da Baliza e Rorainópolis em especial, Ribamar, Gil Neto, Creomar, Ednólia, Marinaldo.

Aos colaboradores Elizete, Elzio e Cleydson pela dedicação

A equipe incansável do Cosme Silva, Laura, Jane, Sônia, Nazaré e Roberto, pela cooperação, muito obrigado

A Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde e Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima/LACEN, pelo apoio a pesquisa

As pesquisadoras Stella Chanet e Heather Michelle Kudyba, pela contribuição

Aos meus colegas do doutorado em especial Raquel, Luciano e Nathalia.

Aos professores do curso de enfermagem pela torcida.

As amigas (Luciana e Elaine) pela energia

A Virginia Araújo Pereira pela amizade e cooperação

Ao Júlio Silva pela contribuição estatística

Ao João Luiz Pereira de Araújo, essencial nesse trabalho, fundamental em minha vida

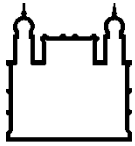
A minha honrada família que é minha referência

Ao meu pai, meu amor, a ti agradeço por me fazer existir e me contar sobre moral e ética.

A minha mãe. A sua presença foi sentida nessa travessia! Obrigado por me aceitar como filho! Obrigado por continuar sendo minha mãe! Obrigado por ser tão presente e assertiva nas minhas intuições. A Ti eu declaro todo meu amor!

A meu anjo da guarda, meu fiel e incansável protetor por todos os livramentos.

A Deus por ter permitido que estas pessoas tenham cruzado meu caminho. Por elas vos peço toda proteção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA AUTÓCTONE E IMPORTADA NO ESTADO DE RORAIMA

RESUMO

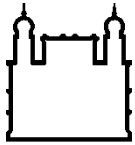
TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Jaime Louzada

No Brasil, a malária se concentra quase totalmente na região norte do país, onde se observa que a dinâmica da transmissão tem múltiplas origens. Nesse extremo norte do Brasil localiza-se o estado de Roraima, na fronteira com Venezuela e Guiana, com fácil acesso por via terrestre. Posição geográfica que pode facilitar a transmissão da malária originada nesses países. Além disso, embora em menor frequência, outros estados da Federação também contribuem para o aumento dessa doença nesse estado. Já a malária autóctone apresenta múltiplas origens, podendo vir de área indígena, de zona rural ou urbana, revelando uma mobilidade de indivíduos com malária dentro do próprio estado. Essa condição se estende para os municípios fronteiriços onde a malária continua a crescer, exigindo uma análise mais aprofundada da relação entre a situação de fronteira e a transmissão da malária no estado. O objetivo deste estudo foi caracterizar o padrão epidemiológico da malária autóctone e importada no estado de Roraima com base nas condições de receptividade dos municípios com maior número de casos importados. Um estudo retrospectivo (dados secundários) extraído do Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica (SIVEP-Malária) permitiu construir uma série histórica (2009 a 2018) envolvendo todos os 15 municípios roraimenses. A análise descritiva dos dados teve como ponto de partida o local provável de infecção (autóctone e importado). Um estudo prospectivo também foi realizado nos municípios de Pacaraima, Boa Vista, São João da Baliza e Rorainópolis com 1329 participantes. Os indivíduos foram submetidos a um questionário semiestruturado e a uma coleta de sangue por meio de punção venosa para realização do exame parasitológico (gota espessa), molecular (PCR) e sorológico (ELISA). O intuito para tal coleta foi identificar as espécies circulantes nesses municípios.

Particularmente em Boa Vista, foi realizada uma análise espacial considerando a circulação de indivíduos com malária importada próximos aos criadouros como perspectiva de aumento do risco de transmissão de malária nesse município. A análise do estudo retrospectivo mostra que a malária autóctone é prevalente em todos os municípios, porém, a distribuição da malária importada entre os municípios é baixa, exceto em Pacaraima e Boa Vista, que nos últimos anos teve incremento importante com pico em 2018. Em relação às espécies, o *Plasmodium vivax* é prevalente entre os autóctones e o *Plasmodium falciparum* entre os casos importados. Já no resultado do estudo prospectivo, a soroprevalência mostra que o *P. vivax* sobressaiu nos quatro municípios estudados, entretanto, o percentual de indivíduos que já foram expostos ao *Plasmodium malariae* é alto, considerando que a detecção deste tipo de malária por microscopia é rara. Da mesma forma, a variação do *P. vivax* (VK210), também foi alta e prevalente nos quatro municípios. Em Boa Vista, foram identificados 23 criadouros com potencial de transmissão; 5 casos de malária autóctones; 271 casos de malária importada dos quais 26 estavam com gametócitos, além disso, 73% dos portadores de gametócitos só procuraram o diagnóstico e tratamento 48 horas após o início dos sintomas. Conclui-se que na série histórica a malária importada é prevalente em Boa Vista em sua maioria introduzida por brasileiros vindo de garimpo da Venezuela e Guiana. Já em Pacaraima, a malária tem procedência quase que exclusivamente da Venezuela em razão do movimento migratório naquele país. No estudo sorológico, foram detectados nos quatro municípios as variações de *P. falciparum*, *P. malariae* e as três variantes do *P. vivax* (VK210, VK247 e o (*Plasmodium vivax-like*). Em Boa Vista, a estatística espacial aponta para aumento de risco de transmissão. De modo geral, o aumento da malária importada no estado pode ter explicação na intensa movimentação em torno dos garimpos ilegais na Venezuela, Guiana e Brasil. Somado a isso, o movimento migratório da Venezuela já é uma realidade em todos os municípios do estado. Esses dois eventos se somam às atividades de mineração dos países vizinhos que historicamente têm forte relação com a malária importada em Roraima, caracterizando essa região como grande problema de malária de fronteira.

Palavras chave: malária, Roraima, fronteira, soroprevalência, espacialidade



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MALARIA AUTOCHTHONOUS AND IMPORTED IN THE STATE OF RORAIMA

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Jaime Louzada

In Brazil, the northern region of the country concentrates almost all malaria, where it is observed that the dynamics of transmission have multiple origins. The state of Roraima is located in this extreme north of Brazil, on the border with Venezuela and Guyana, with easy access by land. Geographic position that can facilitate the transmission of malaria originating in those countries. In addition, although less frequently, other Brazilian states also contribute to the increase of this disease in Roraima. Autochthonous malaria, on the other hand, has multiple origins, which can come from indigenous lands, rural or urban areas, revealing the mobility of individuals with malaria within the state itself. This condition extends to border municipalities where malaria continues to grow, requiring a more in-depth analysis of the relationship between the border situation and the transmission of malaria in the state. The objective of this study was to characterize the epidemiological pattern of autochthonous and imported malaria in the state of Roraima based on the receptivity conditions of the municipalities with the highest number of imported cases. A retrospective study (secondary data) extracted from the Epidemiological Surveillance Information System (SIVEP-Malaria) allowed the construction of a historical series (2009 to 2018) involving all 15 municipalities of Roraima. The descriptive analysis of the data had, as a starting point, the probable site of infection (autochthonous and imported). A prospective study was also carried out in the municipalities of Pacaraima, Boa Vista, São João da Baliza and Rorainópolis with 1329 subjects. The participants were submitted to a semi-structured questionnaire and venipuncture blood collection to perform the parasitoscopic (thick drop), molecular (PCR) and serological (ELISA) exam. The purpose of such collection was to identify the species circulating in these municipalities. Particularly in Boa Vista, a spatial analysis was carried out considering the circulation of individuals with imported malaria near the breeding sites as a prospect of increasing the risk of malaria transmission in that municipality. The analysis of the retrospective study shows that autochthonous malaria is prevalent in all municipalities, however, the distribution of imported malaria among the municipalities is low, except in Pacaraima and Boa Vista, which in recent years had an important increase with a peak in 2018. In Regarding the species, *Plasmodium vivax* is prevalent among autochthonous species and *Plasmodium falciparum* among imported cases. In the result of the prospective study, seroprevalence shows that *P. vivax* stood out in the four cities studied, however, the

percentage of individuals who have already been exposed to *Plasmodium malariae* is high, considering that the detection of this type of malaria by microscopy is rare. Likewise, the variation in *P. vivax* (VK210) was also high and prevalent in the four municipalities. In Boa Vista, 23 breeding sites with potential for transmission were identified; 5 cases of autochthonous malaria; 271 cases of imported malaria, of which 26 had gametocytes, in addition, 73% of gametocyte carriers only sought diagnosis and treatment 48 hours after the onset of symptoms. It is concluded that in the historical series, imported malaria is prevalent in Boa Vista, mostly introduced by Brazilians coming from gold mines in Venezuela and Guyana. In Pacaraima, malaria comes almost exclusively from Venezuela due to the migratory movement in that country. In the serological study, variations in *P. falciparum*, *P. malariae* and the three variants of *P. vivax* (VK210, VK247 and o (*Plasmodium vivax*-like)) were detected in the four municipalities. In Boa Vista, the spatial statistics points to an increase In general, the increase in imported malaria in the state may be explained by the intense movement around illegal mining in Venezuela, Guyana and Brazil. In addition, the migratory movement from Venezuela is already a reality in all countries. These two events are added to the mining activities of neighboring countries that historically have a strong relationship with imported malaria in Roraima, characterizing this region as a major problem of border malaria.

Keywords: malaria, Roraima, frontier, seroprevalence, spatiality

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Aspectos históricos conceituais da malária.....	5
2.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>	8
2.3 Principais vetores de importância epidemiológica	10
2.4 Distribuição da malária no mundo.....	13
2.5 Situação da malária no Brasil no contexto amazônico	15
2.6 A malária no estado de Roraima.....	22
2.7 Geoprocessamento como ferramenta de análise espacial	28
2.8 Proteína Circunsporozoíta (CS)	30
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo geral.....	34
4.2 Objetivos específicos	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 Tipo de pesquisa	35
5.2 Área de estudo.....	35
5.3 População e amostra	38
5.4 Procedimentos de Coleta.....	39
5.4.1 Coleta de dados retrospectivos extraídos do SIVEP-MALÁRIA.....	39
5.4.2 Coleta de dados prospectivos nos municípios de Boa Vista, Pacaraima, Rorainópolis e São João da Baliza no período de 2016 a 2018.....	40
5.5 Critérios de inclusão e exclusão.....	41
5.6 Procedimentos de entrevista e processamento das amostras para o estudo prospectivo.....	41

5.7 Análise espacial dos casos de malária e dos criadouros do município de Boa Vista no período de 2016-2020 para o estudo prospectivo.....	42
5.7.1 Espacialização dos dados pelo Sistema de Informação Geográfica (SIG)	42
5.7.2 Mapeamento dos criadouros e coleta de larva na zona urbana de Boa Vista.....	43
5.8 Procedimentos laboratoriais.....	43
5.8.1 Diagnóstico parasitológico da malária.....	44
5.8.2 Diagnóstico molecular	45
5.8.3 Estudo sorológico para a detecção de IgG específicos para a proteína circunsporozíta.....	46
5.9 Análise de dados	47
5.10 Aspectos éticos.....	48
6. RESULTADOS.....	49
6.1 Número de casos de malária e espécies plasmodiais no estado de Roraima no período de 2009 a 2018.....	49
6.2 Caracterização da malária autóctone e importada em Roraima.....	50
6.3 Espécies plasmodiais na malária autóctone e importada	52
6.4 Malária importada de outros países por espécie de Plasmódio.....	53
6.5 Aspectos sociodemográficos da malária autóctone e importada	54
6.6 Distribuição da malária autóctone e importada nos municípios de Roraima	57
6.7 Risco de Transmissão da malária nos municípios	59
6.8 Análise espacial dos casos da malária importada notificados nos municípios de Roraima.....	61
6.9 Estratificação da malária proveniente de outros municípios	62
6.10 Perfil sociodemográfico e epidemiológico da população de Boa Vista, Pacaraima e São João da Baliza e Rorainópolis no período de 2016 a 2018.....	63

6.11 Caracterização da população de estudo de acordo com o diagnóstico de malária.....	65
6.12 Prevalência de anticorpos para a proteínas circunsporozoíta (CSP).....	69
6.13 Características da população do município de Boa Vista.....	73
6.14 Características dos criadouros da cidade de Boa Vista.....	74
6.15 Distribuição da malária em Boa Vista por local de infecção.....	75
6.16 Distribuição espacial das espécies infectantes de malária	76
6.17 Distribuição espacial de portadores de gametócitos	77
6.18 Risco de transmissão local da malária na zona oeste da cidade de Boa Vista	78
7. DISCUSSÃO	80
8 CONCLUSÃO	95
Perspectivas.....	96
9 REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico plasmodial da malária	9
Figura 2 - Distribuição da malária no mundo, 2016	14
Figura 3 - Distribuição da malária autóctone e importada de países, estratificada por estado da Amazônia legal no ano de 2018	21
Figura 4 - Mapa dos pontos de garimpos em terras indígenas estado de Roraima	23
Figura 5 - Mapa do DSEI Leste de Roraima DSEI Yanomami	26
Figura 6 - Tríade ecológica	29
Figura 7 - Ferramentas de geoprocessamento	30
Figura 8 - Estrutura da proteína circunsporozoíta	32
Figura 9 - Mapa geopolítico estado de Roraima	36
Figura 10 - Busca ativa na zona rural de São João da Baliza e Rorainópolis	44
Figura 11- Fase do processo de experimentos laboratoriais	47
Figura 12 - Casos de malária em Roraima, estratificado por espécie, 2009-2018	50
Figura 13 – Casos de malária em Roraima, por local provável de infecção do período 2009-2018	52
Figura 14 - Distribuição dos casos de malária em Roraima segundo a espécie de plasmódio e o local de origem da infecção no período de 2009-2018	53
Figura 15 - Distribuição dos casos de malária em Roraima segundo espécie de plasmódio estratificado por país	54
Figura 16 - Casos de malária em Roraima estratificado por gênero segundo o local provável de infecção	55
Figura 17 - Casos de malária em Roraima estratificado por faixa etária segundo o local provável de infecção	56
Figura 18 - Casos de malária em Roraima estratificado por ocupação segundo o local de infecção	57
Figura 19 - Distribuição dos casos de malária por municípios de acordo o local provável de infecção	58
Figura 20 - Representação do índice parasitário anual estratificado por município por meio da Série histórica no intervalo 2009-2018	60
Figura 21 - Espacialização da malária importada entre os municípios de Roraima	62
Figura 22 - Prevalência de anticorpos para a proteína CS distribuída por município	70
Figura 23 - Respostas de anticorpos ao tempo desde a última infecção	71
Figura 24 - Índice de reatividade da Proteína CS por local de infecção	72
Figura 25 - distribuição dos casos de malária por espécie, origem e criadouros positivos para formas imaturas de <i>Anopheles</i> spp no ambiente urbano de Boa Vista	77
Figura 26 - Distribuição de gametócitos e vetores no ambiente urbano de Boa vista.	78
Figura 27 - Análise das funções específicas G, F, K, L.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de casos de malária na Amazônia Legal 2003-2019	20
Tabela 2 - Primers PET-PCR utilizados	45
Tabela 3 - Perfil sociodemográfico e epidemiológico por município	65
Tabela 4 - Perfil sociodemográfico da população de acordo com o diagnóstico de malária nas localidades estudadas	68
Tabela 5 - Episódio de malária por local de infecção	69
Tabela 6 - Índice de reatividade (IR) dos anticorpos para as proteínas CS nas diferentes faixas etárias	72
Tabela 7 - Resposta dos anticorpos por gênero	73
Tabela 8 - Características da população de estudo segundo diagnóstico de malária em Boa Vista, Estado de Roraima no período de 2016 a 2018	74
Tabela 9 - Características da infecção por malária importada e autóctone diagnosticada em Boa Vista, Estado de Roraima durante 2016 a 2018	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
ANOVA	Análise de variância
AT	Adenina, Timina
BSA	Bovine Serum Albumin
PBS	Phosphate buffered saline
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEM	Campanha de erradicação da malária
CSP	Proteína Circunsporozoíta
CSV	Controle seletivo vetorial
CT	Ciclo térmico
d.C.	Depois de Cristo
DC	Célula dendrítica
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dos	Densidades ópticas
DP	Desvio padrão
DSEI	Distrito Sanitário Especial Indígena
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GIS	Sistema de informação geográfica
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GPS	Sistema de Posicionamento Global
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IR	Índice de Reatividade
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPA	Índice Parasitário Anual
kDa	Quilo-Dalton
Km	Quilometro
LACEN	Laboratório Central
LVC	Lâmina de verificação de cura
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MIV	Manejo integrado de vetores
MQO	Mínimos quadrados ordinários
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEGM	Programa de Erradicação Global da Malária
RNA	Ácido ribonucleico
SIVEP	Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TECLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFRR	Universidade Federal de Roraima
UNICEF	Fundo Internacional de Emergência das Nações Unidas para a Infância

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença transmitida pela inoculação de protozoários do gênero *Plasmodium*, através da picada de um mosquito anofelino, continua a ser um grande problema de saúde pública global, causando cerca de 216 milhões de novos casos, com aproximadamente 445.000 mortes por ano, especialmente na África (1). Estima-se que a taxa de incidência da malária tenha diminuído 18% em todo o mundo entre 2010 e 2016 (1). Apesar dessa redução, entre 2014 e 2017, um aumento substancial na incidência de casos ocorreu nas Américas, em grande parte devido ao aumento no Brasil e na Venezuela (2,3).

Na América do Sul, especialmente, no Brasil, o número de casos de malária aumentou de 143.748 em 2015 para 194.409 em 2017 após 7 anos de declínio. Na Venezuela (República Bolivariana da Venezuela) esse aumento foi de 91.918 em 2015 para 242.561 em 2016 (4, 5). De acordo com as estimativas da agência de saúde das Nações Unidas, o número de casos de malária na Venezuela atingiu 406.000 em 2017, principalmente na floresta tropical de planície da Venezuela e na região da Guiana (6). A falta de medicamentos para o tratamento da malária e outras medidas de controle resultaram em um número crescente de casos dessa doença na Venezuela. Além disso, as atividades ilegais de mineração no estado de Bolívar (Venezuela), são apontadas como parte do problema que faz com que a doença prevaleça no local e se espalhe para outros países vizinhos, sobrecarregando os serviços de saúde nos municípios fronteiriços do Brasil e da Colômbia (4).

Roraima é o estado brasileiro do extremo norte do país que compartilha fronteiras internacionais com a Guiana e a Venezuela. Na tríplice fronteira, o fluxo migratório é intenso e temporário, mas desde 2017, Roraima vem vivenciando o impacto de um fluxo migratório sem precedentes de venezuelanos devido à crise econômica e política em seu país (7). Segundo o UNICEF e as autoridades de migração no Brasil, uma estimativa de 178.000 venezuelanos cruzaram Roraima, com pelo menos 32.000 assentamentos em Boa Vista, capital do estado, localizada a aproximadamente 100 km da Guiana e a 200 km da Venezuela (5). Um dos principais problemas no aumento da transmissão da doença na Venezuela é o grande fluxo de pessoas oriundas das minas de ouro na fronteira com o Brasil. Certamente, o aumento dos movimentos da população fronteiriça entre Brasil,

Venezuela e Guiana afetou as medidas de controle da malária e contribuiu para a disseminação da doença no estado de Roraima (6).

Dados do Ministério da Saúde, SIVEP-malária (Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica - malária), mostram que o número de casos notificados em Roraima quase triplicou de 8.969 casos em 2016 para 23.369 em 2018. No entanto, 34% desses casos foram importados de outros estados do Brasil (3.630 casos) e de outros países (5.513), principalmente da Venezuela (4.478 casos) e Guiana 610 casos (7). As infecções por *Plasmodium falciparum* foram responsáveis por 9,8% dos casos autóctones e 26% dos casos importados de outros países (7).

Considerando a distribuição da malária no estado de Roraima, Boa Vista se destacou como principal município na notificação de casos importados de países vizinhos. Em 2018, registrou 5545 casos, 168 autóctones, 2115 importados da Venezuela e 533 importados da Guiana. Vale ressaltar que, em 2018, os casos de infecção por *P. falciparum* da Venezuela (481 casos) e Guiana (97 casos) representam 80% das notificações de *P. falciparum* registradas em Boa Vista (722 casos) (7). A Região Amazônica enfrenta uma ameaça significativa do surgimento da resistência à artemisinina e medicamentos associados, em decorrência de uso inadequado, especialmente em populações de alta mobilidade e em áreas de difícil acesso associadas à mineração de ouro no Brasil, Venezuela Guianas (8).

O *P. vivax* é a espécie plasmodial predominante em Roraima, embora, o *P. malariae* esteja presente na Venezuela e nas Guianas, porém, relatos de casos por esta espécie plasmodial em Roraima é raro. O *P. malariae* é subnotificado na maioria das áreas endêmicas de malária no Brasil devido não só à falta de microscopistas treinados como também pela dificuldade da identificação desta espécie no exame microscópico direto em gota espessa, exame de rotina para o diagnóstico da malária no Brasil (9). Apesar da comprovada diminuição da sensibilidade e especificidade em situações de densidade parasitária baixa e infecções mistas, o exame microscópico direto em gota espessa ainda é o método de eleição para o diagnóstico da malária (10).

A reação em cadeia da polimerase-PCR vem sendo cada vez mais utilizada para a detecção molecular e identificação das espécies de plasmódios, por apresentar maior sensibilidade e especificidade (9-11). Os métodos de diagnóstico de malária baseados em exame molecular apesar de serem bastante específicos e sensíveis, são técnicas complexas, com várias etapas e alto custo. Portanto, ainda não podem ser utilizadas para diagnóstico

de rotina. No entanto a PCR pode ser útil como ferramenta complementar na detecção do *P. malariae* e na determinação da prevalência de casos com baixa parasitemia, não detectados ao exame parasitológico (12).

Da mesma maneira, os testes sorológicos específicos para as proteínas do *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* podem identificar as espécies plasmodiais que circulam em uma determinada área endêmica e serem utilizados como indicadores de transmissão e exposição aos plasmódios (13). Como os indivíduos que tiveram malária podem permanecer com sorologia positiva durante muitos anos, a sorologia não pode ser utilizada para diagnóstico mas pode ser utilizada como indicador de contato com o parasito e de transmissão, já que os anticorpos tendem a ser mais elevados em indivíduos infectados recentemente e diminuem uma vez que os parasitos não se encontram mais na circulação. Portanto os testes moleculares e sorológicos são ferramentas importantes para identificar as espécies plasmodiais que entram e circulam no Brasil e na determinação das áreas de transmissão de malária (10).

Em relação aos vetores de malária no estado de Roraima é necessária uma avaliação sistemática do potencial dos criadouros, principalmente aqueles localizados em áreas de maior notificação de casos de malária importada. Em 2014, foram mapeados 89 criadouros permanentes, dos quais 52 estão localizados em área urbana (na cidade de Boa Vista) e 37 em zona rural distribuídos entre todos os municípios. Entretanto, estes criadouros não foram georreferenciados e não existem dados sobre a presença e as espécies de larvas de anofelinos nos criadouros mapeados. Aliado a este fato temos que considerar a importância da identificação desses vetores utilizando-se vários parâmetros morfológicos e uma avaliação detalhada da morfologia e morfometria de todos os estádios do ciclo de vida desses vetores, uma vez que existem espécies de importância epidemiológica já assinalada, que fazem parte de complexos de espécies crípticas. Nesse caso, muitas vezes a análise das fêmeas ou mesmo das formas imaturas isoladamente não levam à identificação correta da espécie, pois os caracteres morfológicos de espécies crípticas se sobrepõem, exigindo o uso de ferramentas de taxonomia molecular.

Portanto, a nossa proposta é caracterizar o padrão epidemiológico da malária autóctone e importada no estado de Roraima utilizando ferramentas da análise espacial que permitam visualizar as áreas onde se concentram os maiores números de casos, a distribuição das espécies, os criadouros potenciais de anofelinos e indicadores sorológicos de exposição, transmissão e associados a resistência ao tratamento. Os dados

entomológicos associados aos dados parasitológicos e sorológicos servirão de base epidemiológica para direcionar com efetividade as medidas de prevenção e controle da doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos históricos conceituais da malária

A Malária é uma doença infecciosa, febril, aguda, de origem parasitária e de transmissão vetorial (14). Trata-se de uma doença antiga também conhecida por maleita, impaludismo, paludismo e febre terçã ou quartã (15). Sua distribuição abrange países localizados principalmente na faixa terrestre tropical e subtropical da linha do equador (1,16). Essas regiões dos trópicos são consideradas subdesenvolvidas ou com baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), cenário ideal para manutenção da cadeia de transmissão da malária (1). Essa condição social, revela um grande potencial para receptividade da malária, além de mantê-la com altas taxas de morbimortalidade e de letalidade, sobretudo, no continente africano (17).

Nesse sentido, é certo mencionar que a relação dessa doença com os bolsões de pobreza pode gerar entraves nas ações de combate e controle da malária. Entretanto, a manutenção histórica desse agravo não pode ser explicada apenas pelo viés econômico, até por que a malária é uma doença de múltiplos determinantes. Por isso, ela é produzida pela junção de vários aspectos que estabelecem relações de natureza biológica, socioeconômica, cultural e ambiental. Esse último aspecto, desde a antiguidade, já havia estabelecido sua correlação com a malária, conforme descrito a seguir (18-20).

Tão antiga quanto atual a malária vem causando transtornos de várias ordens desde sua existência. Atualmente é conhecida por malária, mas ao longo do tempo, a sua nomenclatura foi modificada em vários momentos e lugares no mundo. Independente das variações do seu nome, há evidências de sua existência desde os primórdios da humanidade. Assim, considerando uma linha temporal, há registros históricos em tempos e lugares diferentes que descrevem sintomatologias compatíveis com o quadro clínico clássico da malária atualmente conhecido. Sobre essa temporalidade desde o ano 2.700 a.C. até o século VI a.C. já havia descrições de uma doença mortal que assolava a antiga Mesopotâmia (atualmente, Iraque/Kuwait/Síria) e que se manifestava com estados “morbi febris”. Mais à frente, pensadores gregos e romanos da antiguidade também contribuíram ao descrever quadros clínicos sugestivo de malária (21,22).

Sobre as contribuições desses pensadores, a percepção das primeiras conexões com a causalidade e formas de contágio foram aludidas por Hipócrates (século V a.C.) que

descreveu algumas características epidemiológicas da malária, entre elas a sazonalidade - relação da doença com uma determinada estação do ano: “o outono com os arredores de Atenas”, onde lá havia pântanos (21,22). Hipócrates, ainda descreveu os sinais clínicos dessa doença - “esplenomegalia, calafrios, febre e sudorese” (22). Os romanos (século II d.C.) também associaram essa doença com água parada e febre (febre romana) (21). A partir dessa caracterização feita pelos romanos pode-se atribuir a origem do nome malária com a relativização da tríade (febre, pântano, vapores) denominando de “*ária cattiva* ou *mal'aria*”, o “ar ruim” (21). Portanto, a explicação causal não era atribuída apenas com a água parada, havia outro componente nesse ambiente que era determinante para a manutenção da doença à sua época, a putrefação, matéria comum aos pântanos. Atualmente sabe-se que os vetores da malária vivem em ambientes diferentes descritos àquela época.

Portanto, a representação da malária naquele tempo e lugar se explicava a partir de “vapores pútridos” que exalavam dos pântanos e não exatamente apenas pela presença de água. Foi por meio da evolução da tentativa de se compreender essa e outras doenças que, mais tarde, se construiu a teoria miasmática (século XVII) que explicava as doenças em razão das putrefações de corpos e lamaçais de onde evaporavam ares e odores tão ruins que eram capazes de sucumbir o homem e até uma cidade. A intervenção se dava por meio de medidas preventivas acerca dos “ares”, da “água” e dos “lugares”, no campo da perspectiva higiênica (enterrar), conforme já apontado anteriormente por Hipócrates (21,23).

Assim, a partir de Hipócrates e ao longo dos séculos seguintes a malária foi explicada como enfermidade distribuída pelo ar. Contudo, a percepção do meio ambiente como determinante da malária só foi comprovada cientificamente em 1898 e 1899, pelos italianos Grassi, Bastianelli e Bignami, que descreveram o “desenvolvimento completo das três espécies de plasmódio humano em anofelinos(21,23).Nessa perspectiva científica, surge o embasamento e direcionamento para explicar as morbidades vetoriais concebidas dentro do processo saúde doença, tendo como modelo a história natural da doença esquematizada pela tríade ecológica – hospedeiro, agente e meio ambiente (24,25).

Deixando de lado a explicação empírica sobre a caracterização da malária ao longo da existência humana, para um recorte ou marco científico, é importante traçar um fluxo resumido dos acontecimentos que marcaram os aspectos patológicos da malária de apropriação científica iniciados no século XIX. Assim, já no final desse século, no ano de 1880 foi descoberto na Argélia o parasito da malária por Charles Louis Alphonse Laveran. Mais tarde, em 1885, Machiachava e Celli, reelaboraram as características do parasito

descritas anteriormente por Laveran, além de determinarem o gênero *Plasmodium*. (21,23) Nesse mesmo ano, Golgi e Cols descrevem o ciclo assexuado do *Plasmodium*, abrindo perspectiva para outros estudos realizados em 1886. Por exemplo, a descrição das fases do parasito no homem “estabelecendo a relação do acesso malárico com fim da evolução do parasito no sangue”; além da descrição do “ciclo evolutivo dos agentes da terçã e da quartã” (14).

Já em 1890, Grassi e Feletti estabelecem a nomenclatura das espécies da terçã e quartã respectivamente como – *Haemamoeba vivax* e *H. maláriae* ou *oscillaria*. No ano seguinte foi criado, por Romanowsky, o esfregaço, que é um método de diagnóstico, constituindo-se em um evento importante para o exame da malária e para as intervenções no percurso da doença (20).

Outra descoberta importante relacionada com a transmissão, aconteceu em 1897, quando Welch descobre os gametócitos e os nomeiam como *Hematozoon falciparum*, abrindo caminho para estudos acerca da transmissibilidade. Vários eventos importantes em torno da malária ocorreram entre o período 1948 a 1959, destacando o reconhecimento do ciclo pré-eritrocitário e exoeritrocitário das espécies plasmodiais da malária humana (22).

O cenário científico da malária no final do século XIX, assim como a distribuição dessa doença, concentrava-se na Europa, Ásia e África. Nas Américas, não há informações seguras quanto à introdução da malária. Provavelmente o *Plasmodium vivax* já existisse nas Américas, ao passo que o *P. falciparum*, com os adventos das explorações portuguesa e espanhola, tenha sido introduzido no continente americano. O fato desse *Plasmodium* circular e ser considerado endêmico na Europa, sobretudo, no Mediterrâneo, corrobora com a hipótese da relação desse *plasmodium* com a exploração das Américas (14,15).

Desde sua descoberta o *P. falciparum*, dada a sua letalidade, estimulou a pesquisa em busca de fármacos que tratassem esse tipo de *Plasmodium*. O primeiro medicamento para o combate da malária foi extraído de uma casaca de uma árvore nativa dos Andes da America de Sul, chamada cinchona, que deu origem ao quinino, extraído dessa casca. Além disso, no período de 1974 a 1982, nos Estados Unidos, foi realizado um ensaio clínico importante com a mefloquina para tratamento de pacientes com cepa multirresistentes para o *P. falciparum*. Tratamento disponível para uso desde a década 1980 na Europa e 1990 nos Estados Unidos (26). Considerando que esta forma de malária pode ser fatal, foi um grande avanço na intervenção medicamentosa, no sentido de atuar na prevenção da

mortalidade por malária, principalmente nos continentes africanos e asiáticos, onde havia altas taxas de morbimortalidade.

2.2 Ciclo biológico do *Plasmodium*

Pertencente à família *Plasmodiidae* e ao gênero *Plasmodium* os agentes etiológicos da malária são reconhecidos em cinco espécies de importância epidemiológica e que podem infectar e causar doença no homem: *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881); *Plasmodium vivax* (Grassi e Feletti, 1890); *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), e *Plasmodium knowlesi* (Knowlesi Das Gupta, 1932).

O ciclo de vida do plasmódio (Fig. 1), compreende uma fase sexuada no vetor - mosquitos do gênero *Anopheles* e uma fase assexuada no hospedeiro vertebrado mamífero (homem e macaco). As infecções humanas acontecem quando a fêmea de anofelino infectada realiza o repasto sanguíneo e inocula juntamente com a saliva as formas infectantes, denominadas esporozoítos, na derme do indivíduo. Os esporozoítos podem permanecer por horas no local da picada e as formas que escapam do sistema imunológico e atingem a circulação sanguínea migram para o fígado e penetram nas células hepáticas (27,28).

Uma vez dentro dos hepatócitos os esporozoítos se diferenciam e multiplicam assexuadamente resultando na formação de esquizontes multinucleados com dezenas de milhares de merozoítos. Esta fase do ciclo é denominada de ciclo exoeritrocítico e seu tempo de duração varia de acordo com a espécie plasmodial. Para o *P. falciparum* o tempo estimado é de 8-11 dias, o *P. vivax* 8-17 dias, o *P. malariae* 18-40 dias, o *P. ovale* 10-17 dias e o *P. knowlesi* 9-12 dias (29,30).

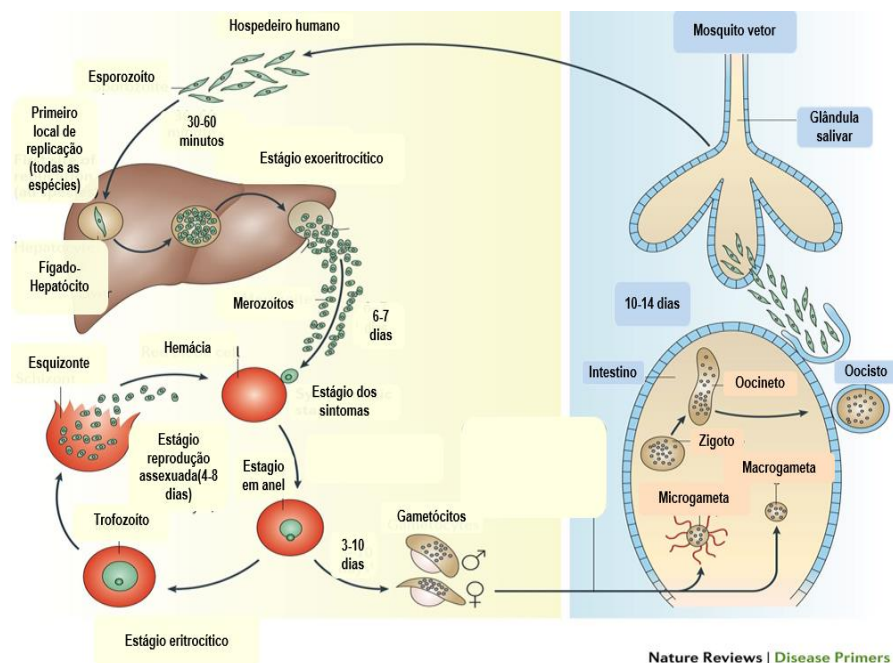
Durante esta fase do ciclo a infecção é assintomática e, no caso do *P. vivax* e *P. ovale*, os esporozoítos podem permanecer em estado de latência nos hepatócitos, transformando-se em hipnozoítos, podendo persistir por um longo período no fígado, após a infecção inicial, causando recaídas observadas em pacientes infectados por estas espécies plasmodiais (31,32).

Após a esquizogonia, os esquizontes maduros liberam gradativamente na circulação sanguínea e os merozoítos teciduais, através de brotamento de vesículas (merossomos) ou por ruptura do esquizonte no hepatócito. Os merozoítos após serem liberados invadem os eritrócitos e se diferenciam em trofozoítos jovens, trofozoítos maduros e finalmente em

esquizontes. Dependendo da espécie, cada esquizonte gera cerca de 10 a 30 merozoítos que invadirão outras células sanguíneas, reiniciando o ciclo eritrocítico. A duração da esquizogonia sanguínea pode ser de 24 horas (febre cotidiana), 48 horas (febre terçã) ou 72 horas (febre quartã), de acordo com a espécie envolvida na infecção. Apenas uma espécie tem ciclo de 24 horas, o *P. knowlesi*, sendo que a grande maioria das espécies apresenta ciclo de 48 horas (febre terçã). Após um período que varia de 3 a 10 dias, conforme a espécie do parasito, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos (32).

O ciclo no inseto inicia-se no momento que o vetor absorve as formas sexuadas (gametócitos) ao sugar o hospedeiro infectado. No interior do intestino do inseto ocorre o processo de gametogênese diferenciando-os em duas formas de gametas que dão origem ao gametócitos masculino e feminino. A fecundação entre o microgameta (masculino) e macrogameta (feminino) resultará, em torno de 24 horas, no zigoto (ovo), depois denominado de oocineto, iniciando o processo de travessia no interior do mosquito até alcançar o intestino médio onde se encista, agora como oocisto. O rompimento do oocisto ocorre em torno de 14 dias, liberando os esporozoítos que circulam pelo organismo do vetor até se alojarem nas glândulas salivares podendo dar origem a um novo ciclo no homem (31,32).

Figura 1 -Ciclo biológico dos parasitos da malária



2.3 Principais vetores de importância epidemiológica

No mundo já foram formalmente reconhecidas 465 espécies vetoriais, das quais, cerca de 65 foram identificadas no Brasil, com apenas 15 de importância epidemiológica para atuarem no ciclo de transmissão. Na região amazônica, o principal vetor da malária é o *Anopheles darlingi*, seguido de *Anopheles albitarsis* e *An. aquasalis*. Além desses, há outras espécies, de importância para a região como o *An. marajoara* e *Anopheles deaneorum*, *An. janconnae*, pertencentes ao complexo *An. albitarsis*, o *An. triannulatus* s.l. e o *An. nuneztovari* s.l., todos de baixa capacidade de transmissão, ou com transmissão restrita a algumas localidades (32-34). O fato de ter papel secundário na transmissão não impede a possibilidade de que algumas dessas espécies se tornem um transmissor primário, pois, em algumas localidades algumas espécies, a exemplo do *An. intermedius*, *An. oswaldoi* s.l e *An. forattinii*, foram encontradas naturalmente infectadas com *plasmódium* (35,37).

O *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* Peryassú, embora não esteja totalmente definido o seu papel como vetor é uma espécie amplamente distribuída na Amazônia e pertencente ao complexo de espécies, constituído por pelo menos três membros: *An. oswaldoi* s.s., *An. oswaldoi* A e *An. oswaldoi* B (38). Esse complexo se adapta a diversas características de criadouro: diversos níveis de tolerância ao sol, tamanho das coleções de água, grande variedade de turbidez, inclusive as suas larvas têm sido coletadas em águas claras ou turvas (39,40)

An. oswaldoi s.l. apresenta ampla distribuição na América do Sul, sobretudo, no oeste dos Andes, em regiões de floresta do interior da Amazônia, inclusive, em locais desmatado como estradas e áreas de cultivos (38). Trata-se de um complexo de espécies que têm hábitos exofágicos e tendência zoofílicas, mas que também fazem o repasto sanguíneo no homem. Membros deste complexo além de apresentar uma alta densidade populacional também apresentam diversidade na sua distribuição (39). Embora, alguns estudos não tenham encontrado essa espécie infectada com o plasmódio, outros apontam seu importante papel dessa espécie na transmissão da malária em diversas localidades da Amazônia brasileira como é o caso dos estados do Acre e de Rondônia e de alguns países da América do Sul, a exemplo da Colômbia (41-55).

An. triannulatus Neiva & Pinto, é outro complexo de espécie abundante em algumas localidades amazônicas, apresentando ampla diversidade comportamental e fenotípica (46-49). Tem ampla distribuição na América do Sul e em determinadas regiões da América Central, inclusive pode ser encontrado desde a Argentina até a Nicarágua e também na ilha de Trinidad (38,50). Esse complexo é composto de pelo menos três espécies: *An. triannulatus s.s.*, *An. halophylus* e uma terceira espécie *An. triannulatus* C. (51). O *Anopheles triannulatus s.l.* apresenta hábitos crepusculares, zoofílico, geralmente o repasto sanguíneo ocorre fora das residências ou no interior das florestas, mas, eventualmente pode ocorrer no domicílio (52-58). Alguns membros desse complexo foram encontrados infectados no estado de Rondônia e em outras regiões do Brasil. Embora, apresente alta densidade populacional, é considerado vetor secundário e ainda carece de estudo para determinar que papel exerce na epidemiologia das regiões do Brasil onde essa espécie foi identificada (57,59).

Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari é um anofelino de grande importância epidemiológica para a malária. Tem ampla distribuição geográfica desde o norte da América do Sul até o leste do Panamá e região Amazônica, além de ser encontrado em alguns estados do nordeste do Brasil (56,60). Na composição desse complexo, foram identificados os seguintes membros: *An. nuneztovari s.s.*, *An. nuneztovari* A, *An. goeldii* e *An. dunhami*. Entretanto, a posição taxonômica de algumas espécies desse complexo ainda precisa de definição. Já se sabe por meio de estudos moleculares que o *An. goeldii* foi finalmente validado como espécie através de caracterização morfológica da genitália masculina de exemplares encontrados no Amapá e por testes moleculares - análises sequenciais do gene mitocondrial citocromo oxidase I - COI, gene *white* e ITS2 em 2008 (61,62). O *An. nuneztovari s.l.* é apontado como vetor primário da malária em várias regiões de Venezuela, Colômbia e Peru (63). Espécies infectadas foram capturadas nos estados de Pará e Amapá e ao longo da BR-174 que liga Roraima ao estado do Amazonas (64).

Como principal vetor da malária, o *An. darlingi*, apresenta distribuição geográfica abrangente encontrado desde o sul do México, norte da Argentina, região ocidental dos Andes até a costa do Atlântico. No Brasil, encontra-se em quase todo o território nacional, exceto, no sertão nordestino e em regiões de elevada altitude (65). Ele é considerado um vetor de alto potencial de transmissão, talvez pela sua predileção antropofílica, apresentando alta densidade populacional, com ampla distribuição geográfica e capacidade

de transmitir todos os plasmódios. Na Amazônia, essa espécie é amplamente distribuída em todos os estados, sendo responsável pela condição endêmica da malária na região (66-69).

O *An darlingi*, apresenta hábitos hematofágicos durante a noite toda, com pico unimodal (meia noite), mas o repasto pode ser bimodal, ou seja, no crepúsculo matutino e vespertino. Geralmente tem preferência por hábitos endofágicos (dentro de casa), porém, a hematofagia pode ocorrer também fora de casa tanto no homem como em animais que podem estar no entorno do domicílio ou próximo a algum criadouro durante alguma atividade laboral ou de lazer (70-75). Após o repasto sanguíneo o *Anopheles darlingi* deposita seus ovos em locais com coleção de água limpa, sombreada ou parcialmente sombreada (represas e remansos de igarapés e lagos). Larvas dessa espécie também tem sido encontrada em coleções de água expostas ao sol ou parcialmente ensolarada (76,77). O desenvolvimento das larvas pode ocorrer em locais mais afastados das margens das coleções líquidas, com presença de troncos, e pequena vegetação flutuante. Contudo, é importante referir que essa espécie vem se adaptando às mudanças provocadas pelo homem como desmatamento, criadouros artificiais (psicultura) e barragens (78). Vários estudos demonstram que populações de *An. darlingi* tem apresentado uma combinação de distinta variação genética e plasticidade fenotípica, que o torna capaz de se adaptar a amplas condições ecológicas, através de diferentes biomas. Essa capacidade se reflete em um certo ecletismo quanto aos picos horários e hábitos alimentares em diferentes ambientes e sazonalidade (79,80).

O conhecimento da fauna anofélica e dos criadouros pela equipe de entomologia dos municípios é uma ferramenta fundamental no controle da malária (81,82). Entretanto, o Ministério da Saúde, reconhece a limitação na capacidade operacional dos serviços de saúde dos municípios, sobretudo, no manejo dos vetores. Por isso, é uma preocupação do programa de controle da malária disponibilizar manuais e capacitar a equipe de entomologia no sentido da sistematização dos “procedimentos inteligentes e na adoção de rotinas de monitoramento e análise para tomada de decisão” (81,82). Dessa forma, no controle vetorial algumas estratégias são recomendadas aos municípios: Manejo Integrado de Vetores (MIV) – é uma tomada de decisão que permite o manejo adequado da população de vetores que envolve vários setores, inclusive, colaboração de várias agências públicas e privadas e a participação comunitária; estratificação epidemiológica – outra estratégia, que envolve a sistematização da análise e interpretação das informações. Com base em

informações epidemiológica, as equipes envolvidas na operacionalização podem definir, por exemplo, as localidades prioritárias para receber algum tipo de intervenção de “controle diferenciado e de intensidade distinta”; Controle Seletivo Vetorial (CSV) – refere-se aos métodos de controle do vetor que devem considerar vários aspectos envolvendo a malária, de modo a definir as prioridades, o conhecimento sobre a fauna das espécies dos mosquitos, a relação do homem com essa fauna e o aporte de recursos humanos e financeiros para a realização das ações de controle vetorial (82).

2.4 Distribuição da malária no mundo

A malária é doença de alcance intercontinental de característica endêmica de ocorrência em vários países do mundo, principalmente aqueles que apresentam baixo IDH. Por essa condição, apresenta índices epidêmicos extraordinários, constituindo um grave problema de saúde pública nos países tropicais, especialmente no continente africano. Em 2018, foram estimados 228 milhões de casos de malária no mundo dos quais 213 milhões (93%) ocorreram no continente africano. O número de óbitos estimado para este mesmo ano foi 416.000 mortes, das quais 383.000 na África (83) (Fig.2).

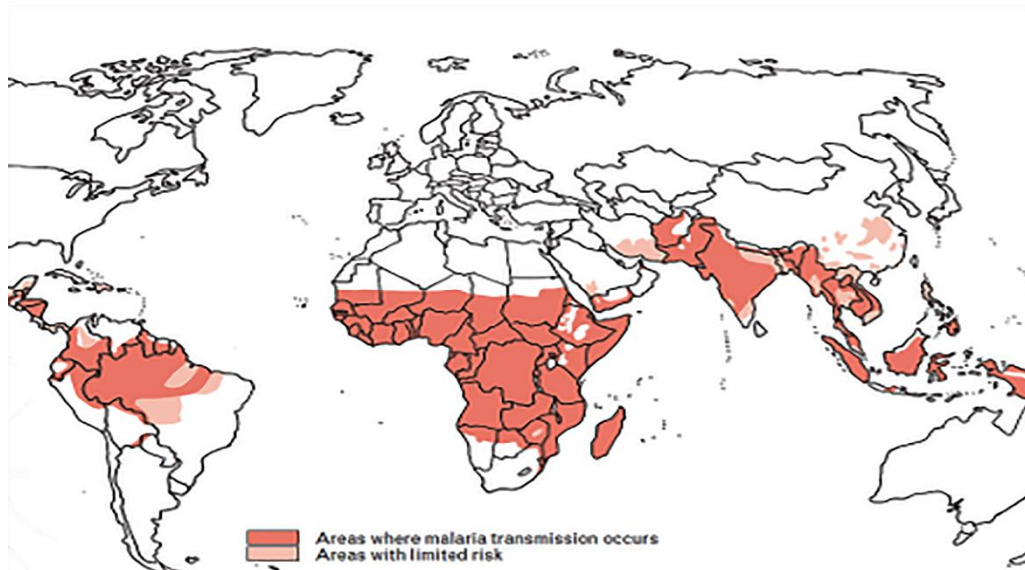
Embora a taxa de incidência global tenha diminuído em 18% entre 2010 e 2016, nas Américas, registrou-se aumento substancial entre 2014 e 2015, impulsionado pelo aumento de casos de malária no Brasil e na Venezuela (83). Outros países nas Américas também tiveram aumento de malária a exemplo da Colômbia, Equador, El Salvador, Haiti, Honduras, Nicarágua e Panamá (1,57). Entretanto, a Venezuela apresentou a pior situação, pois, registrou 91.918 casos de malária em 2015 e 414.527 em 2017, aumento de 351%. A maioria dessa malária foi transmitida em regiões de mineração no estado Bolívar, no sudeste da Venezuela, na fronteira com a Guiana e Roraima (1).

De fato, o estado de Bolívar é um ponto de acesso regional do qual a malária se espalhou para outros países vizinhos, sobrecarregando os serviços de saúde em municípios fronteiriços do Brasil e da Colômbia que recebem casos importados de malária, incluindo por *P. falciparum*, contribuindo com o aumento da malária no Brasil, conforme mencionado anteriormente, de 143.748 em 2015 para 193.837 em 2018 (1).

Dentre as espécies distribuídas no mundo o *P. falciparum* é o parasito mais patogênico, enquanto o *P. vivax* é o mais amplamente distribuído com 7.524 milhões

(3.3%) no mundo. A estimativa para 2018, do *P. vivax* mostra ainda uma alta taxa de incidência, sendo o sudoeste asiático a região com a maior incidência deste parasito (53%) seguido das Américas (75%) e região do mediterrâneo oriental (29%). Já o *P. falciparum*, é o parasito mais prevalente na África (99,7%) seguido do sudoeste da Ásia (50%), na região do Mediterrâneo oriental com (71%) e região do Pacífico ocidental com (65%) (1).

Figura 2- Distribuição da malária no mundo, 2016.



Fonte: IAMAT – International Association for Medical Assistance to Travelers, 2016

A manutenção de altas taxas da morbimortalidade posiciona a malária, ainda, como um grande problema de saúde no mundo. A OMS vem se esforçando para diminuir sua incidência ou eliminá-la, criando para isso, uma agenda global com estratégias, protocolos e metas para o ano de 2020. Algumas dessas estratégias como o aumento dos investimentos financeiros e os esforços na prevenção, no diagnóstico e no tratamento vêm reduzindo significativamente a incidência e a mortalidade causada pela malária em vários países, inclusive alguns deles já foram certificados como livres da doença (83). Desde 2000, o aumento no financiamento e os esforços em prevenção, no diagnóstico e no tratamento têm levado a redução da incidência e da mortalidade causada pela malária.

Considerando a estratificação epidemiológica no mundo, verifica-se que a malária ocorre em regiões tropicais e subtropicais, apresentando comportamento e padrão heterogêneos, inclusive, que se repete na Amazônia, onde a incidência é constante e subsequente, o que a torna região endêmica (83).

Essa condição endêmica pode ser caracterizada por fatores múltiplos que são determinados pela cadeia de transmissão - vetor-homem-parasito, tais como: fatores ecológicos que correspondem às condições ambientais; fatores socioculturais, que são determinados por atitudes e comportamento da coletividade; fatores econômicos e políticos. Todos esses fatores podem interferir na dinâmica da transmissão e no nível do risco de exposição da malária (58,84,85).

2.5 Situação da malária no Brasil no contexto amazônico

A malária no Brasil foi descrita desde a data de 1587, entre os indígenas Tupinambá, povos que tiveram relatos de febre terçã e quartã. Em 1898, Adolfo Lutz fez a associação da doença com *Anopheles cruzi*, disseminada entre trabalhadores durante a construção da estrada de ferro São Paulo-Santos. Em 1950, Carlos Chagas comprova que a transmissão da malária é intradomiciliar, fato que permitiu o controle do vetor por meio do uso de imagocida ou adulticida à base de enxofre queimado nas habitações (86,87). No final do século XIX, a disseminação da malária atingia quase todo território nacional, nas principais cidades costeiras do Brasil. Outro registro histórico importante, foi a epidemia no Rio Grande do Norte e Ceará, no início do século XX, causada pelo *Anopheles gambiae*, o que resultou num esforço global para evitar a disseminação desse vetor de alta capacidade de transmissão para as Américas (88).

Na região amazônica, no século XIX, o fenômeno da migração nordestina em busca da extração do látex foi o marco dos primeiros registros de epidemia e de mortes por malária. A epidemia se espalhou por várias localidades da Amazônia, geralmente, associada com a extração do látex e com a construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré, hoje, no estado de Rondônia (89). Em razão da importância epidemiológica da malária no Brasil, que teve reflexo social e econômico principalmente no norte do país, várias ações de controle foram implantadas em diferentes regiões brasileiras. Diversos planos de ação e medidas de controle foram executados ao longo do século XX (90). Assim, a primeira campanha no combate da malária foi realizada em 1905 pelo médico Carlos Chagas durante a construção do porto de Santos, em São Paulo. Nessa época, conhecedor da endofilia do vetor, Carlos Chagas, instituiu o uso de telas nas janelas e borrifação nas casas como medida de intervenção contra a forma adulta do vetor. Essa ação foi bastante exitosa, pois houve redução expressiva dos casos de malária nessa região (91,92).

Além da intervenção no domicílio, outras medidas de controle vetorial foram utilizadas no decorrer dos anos. Assim, a partir da década de 1920, na região costeira do Nordeste, o manejo ambiental por meio da drenagem dos criadouros foi uma medida eficiente que impactou na redução da malária nessa região. Entretanto, a partir de 1940, explodem vários surtos e epidemias de malária em todo território nacional atingindo cerca de 70% dos 1986 municípios oficialmente reconhecidos. Fato que expôs ao risco aproximadamente 31 milhões de indivíduos com aproximadamente 8 milhões de casos de malária e 80 mil mortes (93,94). Diante da gravidade da situação, iniciou-se uma campanha de combate em nível nacional. A primeira medida foi a adoção de uma nova droga antimalárica, cloroquina (CQ), somado à sistematização da borrifação intradomiciliar com o DDT, inseticida residual de ação prolongada. Essas duas medidas tiveram impactos positivos para a redução drástica da malária em grande parte do território brasileiro, embora surtos localizados ainda persistissem, a exemplo de São Paulo, que chegou a registrar 180 mil casos de malária, e do surto no sul do país. A ocorrência da malária na região sul foi atribuída à presença do anofelino, do subgênero *Kerteszia*, sobretudo pela espécie *An. cruzii* e *An. bellator*, que habitam as bromélias, plantas epífitas abundantes na Mata Atlântica. Em 1950, além das medidas de controle domiciliar e tratamento, foram destruídas cerca de 25 milhões de bromélias. Em razão dessas medidas, houve uma tendência de queda que se prolongou nas décadas subsequentes – 40 mil casos/ano na década de 1940; cerca de 5 mil na década de 1970 e apenas 71 casos em 1982. Atualmente a região sul e sudeste conseguiram reduzir drasticamente a malária na Mata Atlântica (86, 95).

Em 1957, o Serviço Nacional de Malária criou uma campanha denominada “Campanha de Erradicação da Malária (CEM), visando, a erradicação da doença, utilizando para isso a abordagem passiva e ativa dos moradores de áreas endêmicas, além, do tratamento com cloroquina e a borrifação com DDT. Esse programa seguia a mesma estratégia de controle orientado conforme o Programa de Erradicação Global da Malária (PEGM) instituído pela OMS em 1955 (95, 96). Nos anos seguintes à implantação desse programa no Brasil, a malária ainda estava fora de controle com seu pior índice em 1966 quando se registrou 106.890 casos no Brasil, dos quais 53,1% foram causados por *P. falciparum* contra 49,1% por *P. vivax*, entre outras espécies. Contudo, essa campanha foi exitosa em diversas regiões do país, na medida em que houve uma redução extraordinária na incidência da malária em quase todo território nacional, em torno de 50% em algumas

regiões. Já na região Sul, Centro-Oeste e Nordeste, a malária foi eliminada em 1970, mas somente em 1979 essas regiões foram declaradas livres de transmissão da malária, porém atualmente essa região voltou a apresentar foco dessa doença. Entretanto, essa experiência exitosa em parte do território brasileiro não teve o mesmo sucesso na região amazônica (97,98). Algumas explicações para a baixa efetividade desse programa no norte do país pode estar associada à transmissão extradomiciliar, inviabilizando o uso do DDT, ou mesmo à transmissão intradomiciliar, devido às habitações com superfícies inadequadas (parede) para receber e garantir a efetividade residual do inseticida, como por exemplo as malocas indígenas, diferente de outras habitações do Brasil. E mesmo as casas da população ribeirinha, construída com tábuas, com grande espaço entre uma e outra.

Em 1970, foram notificados 52 mil casos de malária no Brasil, dos quais 73% foram registrados na Amazônia. Essa disparidade em relação às demais regiões do país tem várias explicações: as características ambientais e climáticas favorecem a permanência do vetor, tipos de habitação, dificuldade de acesso às comunidades, grande densidade da população dos principais vetores com ampla distribuição no espaço amazônico, características que dificultam a operacionalização das medidas de controle dos vetores. Além disso, a intensificação do movimento migratório na década de 1980, com impacto na incidência da malária na região Norte, que registrou aumento contínuo de 169 mil para 443 mil casos, dos quais respectivamente 96% e 99% foram notificados na região Amazônica (98).

O PEGM universalizou ou utilizou os mesmos métodos de controle para as regiões malarígenas do planeta. Segundo alguns autores, houve um equívoco estratégico ao não considerar as especificidades geográficas, econômicas e políticas de cada região, pois em algumas regiões os métodos utilizados conseguiram atingir o propósito da redução da malária e em outras regiões o método fracassou (98-102). O Brasil reproduziu tais especificidades onde a diversidade também não foi considerada, e da mesma forma o êxito na redução da malária foi alcançado apenas em algumas regiões do país. A região Norte ilustra essa diversidade e por isso, apresentou baixa efetividade do controle da malária nesse período (98).

Nesse sentido, a execução das ações da malária no espaço amazônico sempre foi um desafio para o processo de intervenção, fato que dificultou a implementação do CEM, mostrando a inviabilidade de um modelo único de controle da malária para o Brasil. No intuito de desconstruir esse modelo, na década de 1980, foi implantada a “estratificação epidemiológica”, abordagem que levava em consideração os aspectos epidemiológicos,

ambientais, geográficos, sociais e econômicos entre outras especificidades regionais, a exemplo de terras indígenas (97, 98). Assim, o planejamento das ações seguia um fluxo, começando pelo levantamento epidemiológico, diagnóstico situacional, das regiões endêmicas da doença, identificando as localidades prioritárias para o recebimento de recursos humanos, materiais e financeiro, viabilizando a operacionalização das ações de controle da malária (103).

Em 1986, uma iniciativa do governo brasileiro foi a implantação de um programa específico para a região amazônica denominado de “Operação Impacto”. Em verdade foi outra forma de abordagem para o uso de DDT, e do tratamento da malária realizado por critério de zoneamento geográfico. Esse método visava a massificação do tratamento dos doentes, identificados por meio de busca ativa, simultaneamente ao combate vetorial, realizado por meio de borrifação intradomiciliar. Contudo, esse programa foi muito criticado pelo alto custo e pela sua ineficiência, pois, a expectativa de redução da malária não se concretizou na região amazônica, ao contrário, houve incremento da malária nesse período (92). Talvez essa ineficiência teve como causa, o fato que a hematofagia pode ocorrer também fora do domicílio, dificultando a redução da doença na Amazônia, além das especificidades habitacionais referidas anteriormente.

A partir do ano 2000, as ações de controle da malária passam para a gestão da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), que tem como função coordenar os programas de controle das doenças transmissíveis no âmbito nacional, compartilhada com estados e municípios. Atualmente, há várias diretrizes do Ministério da Saúde com foco nas medidas de proteção e controle da malária pactuadas entre as três esferas de governo: a “integração das ações de vigilância, prevenção e controle da malária na atenção básica” são medidas essenciais que ampliam o acesso ao diagnóstico e tratamento, além de aumentar o contingente humano no monitoramento da malária, inclusive pela equipe da estratégia saúde da família. Outra medida importante, foi a participação da comunidade e a mobilização social, estratégia que permite a apropriação da comunidade nas questões da malária.

Desde a primeira campanha no combate da malária realizada por Carlos Chagas em 1905 até os dias atuais, considerando todas as dificuldades operacionais, é inegável a redução da malária na região Norte. Além disso, a condição de “região livre da malária” adquirida e mantida na maioria dos estados brasileiros é reflexo de medidas assertivas e de pesquisas realizadas ao longo das décadas no mundo e no Brasil. Contudo, a malária na

Amazônia legal, se revela ainda como um grande desafio de saúde para os estados que compõem essa região como pode ser observado na Tabela 1.

Hoje alguns fatores vêm interferindo na tentativa de controle da malária no norte do Brasil, como é o caso do fluxo de pessoas dos países limítrofes e da malária importada, que distribuída entre os estados, sempre se apresentou baixa (2,3%), quando comparada aos casos autóctones (95,0%) observado na tabela 1. Assim como os importados de outros municípios e estados da federação (2,7%) também têm baixa incidência em relação aos casos de malária autóctones (7). Porém, analisando individualmente, em alguns estados a malária importada representa um problema de saúde importante, em virtude do número desses casos. Por exemplo, o estado de Roraima se apresenta como o maior receptor de malária importada entre todos os demais estados do Brasil. Para ilustrar a irregularidade na distribuição da malária, o estado do Amapá em 2004, teve a maior ocorrência desse tipo de malária dentre todos os estados, 5.776 (27,9%), reduzindo significativamente nos anos subsequentes (7).

Já a malária autóctone, sempre se mostrou expressivamente maior do que a malária importada de outros países e outras unidades da federação. Esse tipo de malária apresentou, no acumulado, uma média de 292.755,4 com desvio padrão de 140.005,53 e mediana de 254.364, representando 95% de toda a malária do período. O IPA desse intervalo teve seu maior índice em 2005, nos anos seguintes observa-se um declínio sistemático com menor registro em 2016 (7)

Essa tendência de queda tanto da malária importada quanto da autóctone é reflexo de várias frentes de atuação e de intervenção do Ministério da Saúde junto às vigilâncias do estado e dos municípios, tais como: capacitação dos gestores, aumento dos laboratórios de diagnóstico, atuação dos Agentes Comunitários de Saúde junto a equipe de controle da malária, dentre outras medidas assertivas implementadas em vários programas como políticas de saúde. A compreensão e apropriação da realidade amazônica, a partir do modelo “estratificação epidemiológica” da década de 1980 hoje difundida e internalizada pelos atores ou agentes de intervenção, foi crucial para o enfrentamento da malária concentrada em espaços tão dispersos, diversos e complexos como os do território amazônico.

Tabela 1- Número de casos de malária na Amazônia Legal no período de 2003 à 2019

ANO	TOTAL	AUTÓCTONE	UF	IMPORTADA/PAÍS (%)	IPA
2003	408.762	390.84	10.22	7.704 (1,9)	18,3
2004	464.899	439.569	14.03	11.299 (2,4)	20,5
2005	606.068	580.816	16.29	8.960(1,5)	26,7
2006	549.38	522.916	16.97	9.497 (1,7)	23,3
2007	457.469	435.83	12.89	8.749 (1,9)	18,7
2008	314.906	298.287	10.53	6.091 (1,9)	12,9
2009	308.4	293.23	8.394	6.776 (2,2)	12,5
2010	333.461	318.049	7.403	8.009 (2,4)	13,1
2011	265.848	254.364	5.89	5.594 (2,1)	10,3
2012	241.806	228.577	5.968	7.261 (3,0)	9,2
2013	178.089	165.015	4.514	8.560 (4,8)	7,0
2014	143.748	135.883	3.239	4.626 (3,2)	5,3
2015	142.698	135.162	2.839	4.697 (3,3)	5,2
2016	128.746	120.304	3.63	4.812 (3,7)	4,6
2017	193.916	183.84	5.395	4.681 (2,4)	6,9
2018	193.838	181.404	5.828	6.606 (3,4)	6,8
2019	156.915	146.786	6.165	3.964(2,5)	5,4

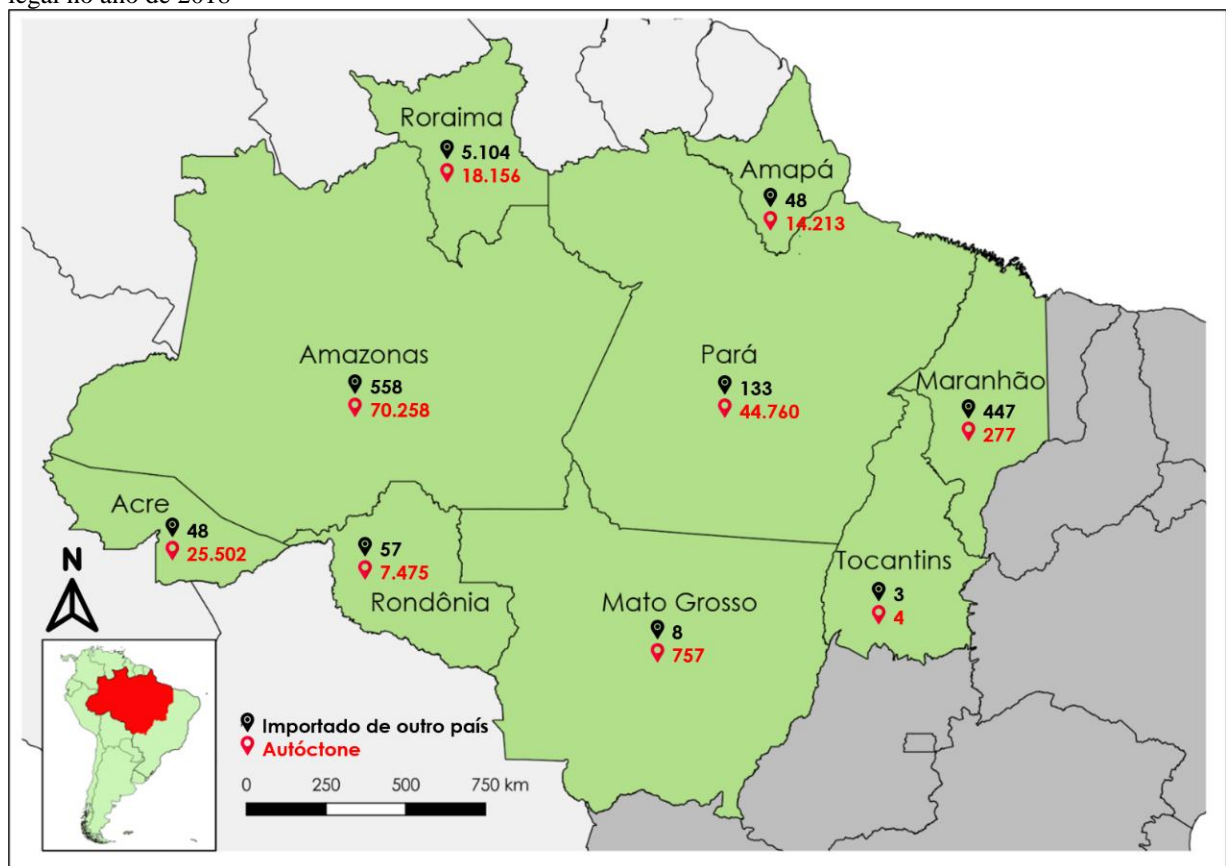
Fonte: SIVEP, Brasil, 2020

Analisando apenas o ano de 2018, estratificado por estado, a incidência da malária autóctone em relação à importada é significativamente maior em todos os estados, como pode ser observada na figura 3. Alguns desses estados, estão no patamar de baixo risco de transmissão de acordo a classificação do Ministério da Saúde: Maranhão registrou (IPA=0,1); Mato Grosso, (IPA=0,3); Pará, (IPA=5,4); Rondônia, (IPA=5,4); Tocantins, (IPA=0,0). Já no estrato moderado risco de transmissão estão inclusos o estado do Acre (IPA=30,5), Amazonas (IPA=17,6), Amapá (IPA=18,4) e Roraima (IPA=40,5). Portanto nenhum estado do Norte apresentou alto risco de transmissão. Entretanto, é possível que dentre os municípios haja alguns que se encontram dentro desse estrato, como é casos de alguns municípios de Roraima. Amazonas foi o estado que apresentou o maior número de casos de malária autóctone e Roraima o maior em casos importados. As ocorrências da malária por *P. falciparum* foram maiores no Amazonas, com 8.522 casos, equivalentes a 12,9% do total de malária e no Acre, com 5.684 casos, representando 22,5% desse total (7).

A malária importada foi registrada em todos os estados. Roraima, Amazonas e Maranhão apresentaram os maiores índices dentre os demais estados. Venezuela, Guiana e Francesa, foram os países que mais contribuíram com a malária importada. Embora, relativamente baixa em relação à malária autóctone, essa malária adquirida fora do

território brasileiro deve ser motivo de preocupação, principalmente, porque em alguns estados, a malária causada pelo *P. falciparum* é majoritariamente importada. Por exemplo, Roraima, foi o estado que mais notificou esse tipo de malária em 2018 e pela sua condição fronteiriça com os dois países que mais contribuíram com malária importada no Brasil, essa preocupação deve ser redobrada e ações efetivas de controle sanitário devem ser sistematizadas. (Fig. 3)

Figura 3- Distribuição da malária autóctone e importada de países, estratificada por estado da Amazônia legal no ano de 2018



Fonte: o autor

Portanto, na Amazônia, a distribuição da malária precisa ser percebida no contexto de suas diversidades culturais, geográficas e ambientais e atualmente também na perspectiva do processo migratório (104,105). São essas as características necessárias para o entendimento dos diferentes comportamentos da malária dentro do universo amazônico. Tais diversidades refletem, sobremaneira, na transmissibilidade desse agravo, porque a sua propagação está relacionada historicamente com a forma de ocupação da Amazônia produzindo “mudanças climáticas”, “movimentos migratórios”, e a “ocupação

desordenada das periferias das grandes cidades”. Além disso, há os projetos de reforma agrária, exploração madeireira, pecuária e agricultura e invasões. Tudo isso traz como consequência o desmatamento, logo o desequilíbrio ambiental refletindo no potencial de transmissão da malária num determinado espaço (85,98).

2.6 A malária no estado de Roraima

O estado de Roraima foi criado na Constituição de 1988, porém, o seu povoamento inicia-se efetivamente com a crise do ciclo da borracha, no Amazonas, entre os anos 1910 a 1920. Essa crise estimulou o movimento migratório de nordestinos para o território, em busca de trabalho, nas fazendas de gado e posteriormente nas atividades de mineração. Em 1943, por meio de um decreto, o Governo Federal criava o Território Federal do Rio Branco, ainda anexado ao Amazonas, tornando-se independente somente em 1962, com mudança em sua nomenclatura para Território Federal de Roraima (106).

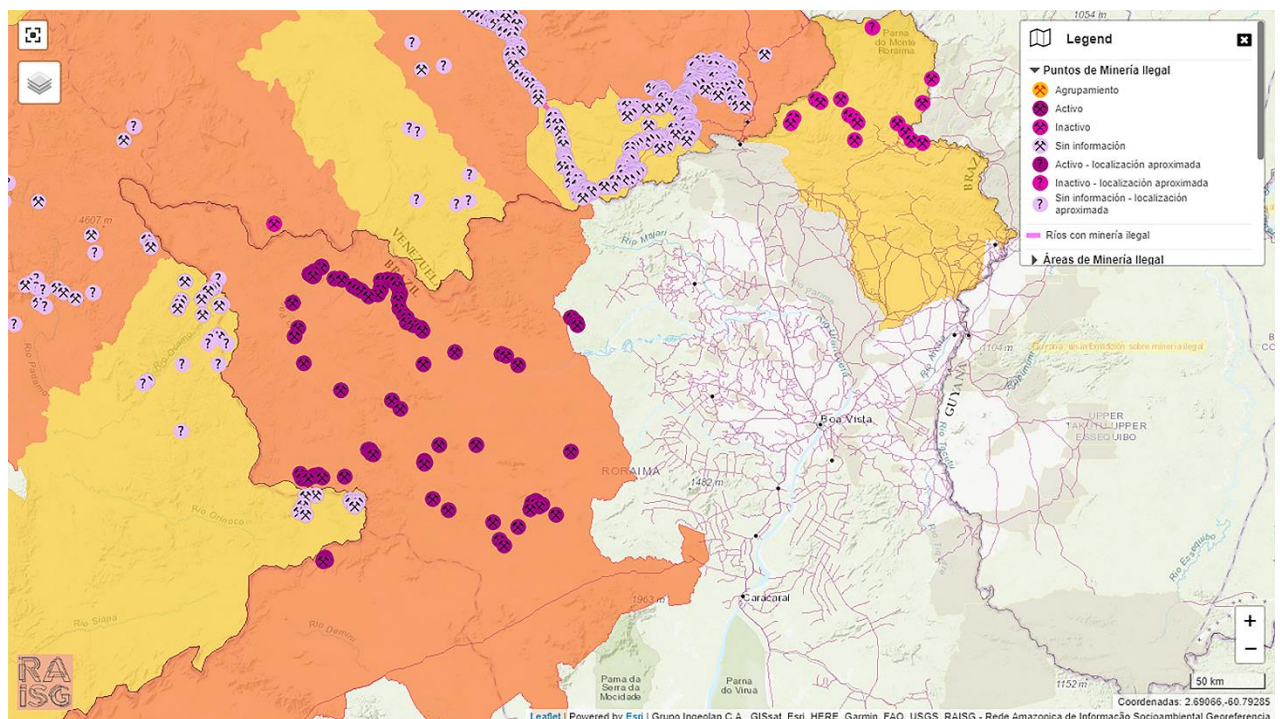
O processo de formação do território, apresentou três missões: a defesa, o povoamento e a “civilização” dos indígenas. Já a urbanização do estado, foi estimulada pela organização das instituições públicas; investimento social e pelo interesse particular de cada indivíduo na formação das cidades (106). Dentro do processo de urbanização alguns fatores foram decisivos para a sua formação e identidade nos dias de hoje.

Assim, na criação das cidades, o fator econômico sofreu várias intervenções ao longo da existência do estado. Inicialmente, ainda no território Rio Branco, as fazendas de gado foram responsáveis pelo movimento migratório, tendo o povoamento das zonas rurais ocorrido simultaneamente com as atividades garimpeiras que tiveram seu pico em 1930 (105).

A extração madeireira na economia era flutuante, dependia quase que exclusivamente da exportação para a Venezuela. Quando havia restrição no comércio com este país, restava apenas o mercado interno, fabricações de móveis e construção civil (105,106). Esse fato estabeleceu uma crise social que por sua vez refletiu no processo de garimpagem que nas décadas seguintes, marcaram a exploração ilegal de ouro, principalmente, em terras indígenas. Assim, as atividades de garimpagem foram responsáveis pelo grande fluxo de pessoas no estado, conseqüentemente, em 1980 houve o maior incremento, 13.590 casos de malária em Roraima (98,106).

Nesse sentido, a forma de ocupação do estado, sobretudo na capital, produziu uma dinâmica espacial em torno do garimpo, haja vista que o monumento principal da cidade de Boa Vista é uma escultura da figura de um garimpeiro. Essa dinâmica estabelecida nesse espaço revela, dentre outros determinantes, o de saúde (malária, mercúrio), o social com as mazelas sociais e ambientais (poluição dos rios, desmatamento). Além disso, populações tradicionais, como os indígenas, vêm sendo expostas às doenças infecciosas em razão do contato com garimpeiros. Nessa dinâmica, atualmente são catalogados 862 garimpos ilegais sendo que a sua maioria estão localizados em terras indígenas como pode ser observado no mapa a baixo (Fig.4) (107).

Figura 4 - Mapa dos pontos de garimpos em terras indígenas estado de Roraima



Fonte: RAISG- rede amazônica socioambiental georeferenciada

O comportamento epidêmico da malária nesse estado não é diferente das demais regiões da Amazônia Legal. Entretanto, quando se analisa a malária importada de outros países, Roraima se difere dos demais pelo volume de casos de malária procedentes dos países localizados em seu entorno, tais como Venezuela e Guiana. Outros países, a exemplo da Guiana Francesa e Suriname, em menor ocorrência, também contribuem para o incremento da malária importada no estado. Assim, a posição geográfica do estado, bem como aspectos sociais e econômicos em torno da mineração ilegal corroboram para a

manutenção da malária importada no estado, promovendo grandes fluxos de pessoas entre os garimpos e a capital Boa Vista, município que absorve os produtos da mineração.

Já a redução da malária autóctone no estado constitui um desafio, dada a dificuldade operacional nas ações de controle vetorial ou mesmo no acesso ao diagnóstico e tratamento precoce na zona rural e área indígena. Essas regiões remotas de difícil acesso, contribuem para a manutenção da malária autóctone na maioria dos municípios que possui povos indígenas.

A malária registrada no período entre 2003 a 2005, teve incremento de 197,1% com 10.757 em 2003 contra 31.964 em 2005. Nesse período a malária por *P. falciparum* acompanhou esse incremento apresentando seu maior registro em 2005 com 6.463 casos sua menor ocorrência em 2003 quando foram notificados 1.869 casos por esta espécie. A malária causada pelo *P. vivax* também apresentou incremento, com seu maior IPA em 2005 (7). Nesse ano apenas o município de Boa Vista esteve no estrato de baixo risco de transmissão, os demais foram considerados locais de alto risco de transmissão, destacando o município do Cantá como a pior situação com 615,8 de IPA (7).

No período de 2006 a 2008, em relação ao IPA, nota-se que dos quinze municípios com transmissão de malária, seis ficaram no estrato de baixo e moderado risco e nove foram notificados com alto risco. Analisando o IPA por ano, observa-se que os municípios de Alto Alegre, Boa Vista, Normandia São Luiz do Anauá e Uiramutã flutuaram entre baixo a moderado risco de transmissão, os demais ficaram no risco de alta transmissão, exceto Amajari, Bonfim e Pacaraima no ano de 2007 e Caroebe e São João da Baliza em 2008 (7).

A malária importada teve um percurso difuso durante o período. Nesse triênio foram notificados 1.008 (33,2%) casos de malária procedentes da Venezuela e 2.024 (66,8%) da Guiana. Quando se analisa por município, Boa Vista com 2.636 casos (84,1%) se destaca em números de notificações por ser rota para os demais municípios, além disso é a grande receptora dos produtos dos garimpos. Os demais municípios, em conjunto, registraram 497 casos de malária e Caroebe foi o único onde não houve notificações. Exceto Boa Vista e Pacaraima todos os demais municípios ficaram abaixo de 50/1.000 casos por ano (7).

É importante referir que grande parte da malária no estado é proveniente de áreas indígenas. Há dois distritos sanitários responsáveis pela saúde das diversas etnias que vivem em Roraima: Distrito Sanitário Especial Indígena (DSEI) Leste de Roraima, que atende às etnias Makuxi, Taurepang, Ingarikó, Waiwai, Patamona e Wapixana. Já o DSEI

Yanomami assiste aos Yanomami e Ye'kuana, inclusive aos Yanomami que vivem no estado do Amazonas (Fig.5).

Nesse mesmo triênio (2006-2008) a população indígena atendida pelo DSEI Leste de Roraima apresentou médio risco de transmissão com menor IPA (17,3) em 2008 e o maior (34,6) em 2006 e média (1.277,6) de casos positivos. A malária por *P. falciparum* teve sua maior ocorrência em 2006 com 25,9% do total dos positivos (n= 482). Comparando 2008, que registou 851 casos de malária, com o ano de 2018, observa-se um aumento 275,6% (n=3.196) com IPA de 61,8, três vezes maior do que o registrado em 2006 (7).

O acesso entre a cidade de Pacaraima e a capital Boa Vista é feito pela BR 174, onde está localizado, às margens da rodovia, o polo base Sorocaima II composto por várias comunidades indígenas. Esse polo, apresentou maior ocorrência de malária em 2018 dentre todas as comunidades indígenas atendida pelo DSEI Leste de Roraima. Em 2008, especificamente essa comunidade registrou 73 casos de malária e IPA de 19,4 contra 1.471 e IPA 391,7 em 2018 com aumento de 1.915% dos casos de malária (7).

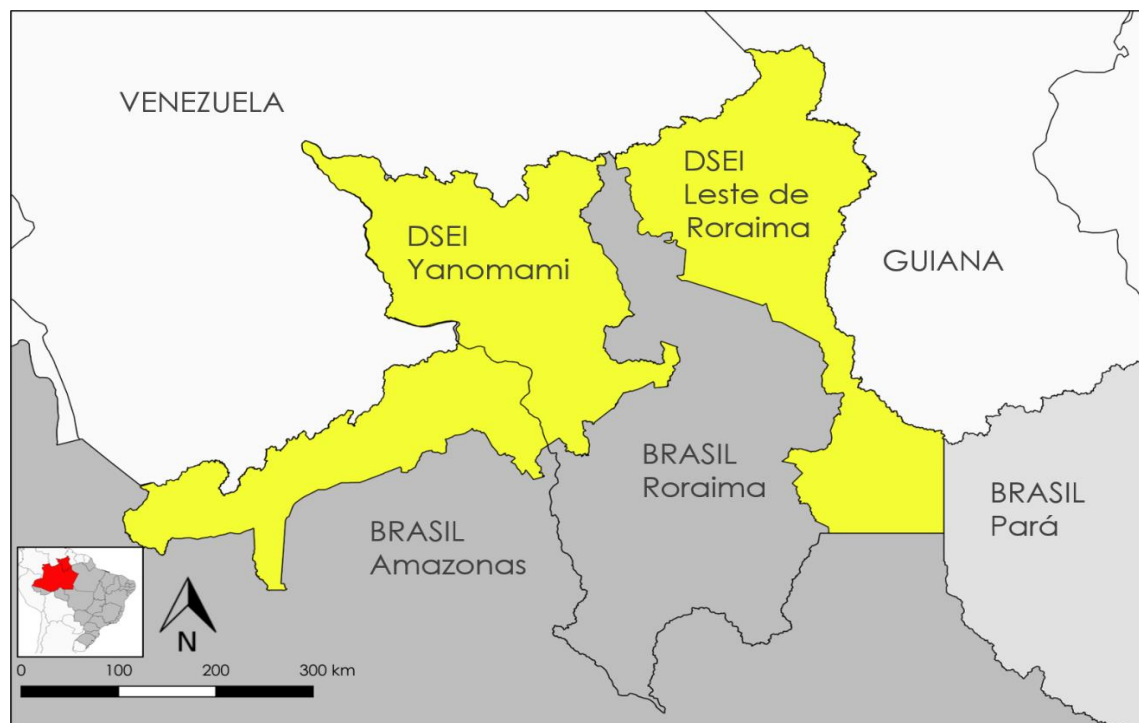
No DSEI Yanomami/Ye'kuana há evidências que o aumento da malária em algumas comunidades indígenas Yanomami está relacionado com a presença maciça e crescente de garimpeiros iniciada em 2018, especialmente no Polo Base Waikás que atende 194 indígenas distribuídos em três comunidades. No entorno dessas comunidades, garimpos ilegais se multiplicam criando situação de risco para os indígenas, inclusive expostos a indivíduos com malária num ambiente com presença de criadouros. Em 2017 estas comunidades registraram apenas 10 ocorrências de malária com IPA de 51,6, aumentando em 2018 para 92 casos. Em 2019 essas comunidades registraram um pico de 1.157 casos de malária e IPA de 5.964 (7) (Figura 5).

A malária entre os indígenas do estado de Roraima é autóctone e não há relação direta com malária importada de outros países, basta observar que a maioria dos municípios do estado tem baixa ou quase ausência de malária importada, exceto Pacaraima e Boa Vista. Particularmente em Pacaraima o aumento excepcional da malária indígena precisa ser investigado, pois não é seguro afirmar que tal aumento tenha correlação com movimento migratório de não indígenas e indígenas venezuelanos. Por isso é importante averiguar a existência de outras causas que promoveram tal aumento no município de Pacaraima.

Diferentemente da malária nos indígenas do município de Pacaraima, entre os Yanomami, a malária vem aumentando em regiões de baixa ocorrência nos últimos anos e

está associado à presença de garimpeiros. A circulação desses indivíduos num ambiente receptivo onde se estabelece um contato muito próximo entre indígenas e garimpeiros pode gerar um problema de saúde que vai além da malária de difícil solução considerando a complexidade logística, geográfica e cultural do povo Yanomami.

Figura 5 - Mapa do DSEI Leste de Roraima DSEI Yanomami



Fonte: o autor

Desta forma é fundamental identificar os determinantes associados ao processo de transmissão da malária em Roraima, haja vista que o comportamento e a distribuição espacial dessa doença é heterogênea, apresentando uma relação estreita com a dinâmica de diferentes espaços: zona rural e urbana, área indígena e regiões de fronteira. Esta última constitui um grande problema no processo de produção e intervenção desse agravo, dinâmica associada à malária ainda pouco estudada nesse estado. Por isso é importante entender as vertentes conceituais, assim como a dinâmica dessa região de fronteira e os processos de intervenção e do controle sanitário envolvendo as doenças transmissíveis.

Fronteira é um espaço geralmente associado à linha divisória internacional entre dois ou mais países (108,109). Esse espaço é caracterizado pela faixa de fronteira que se estende a partir de uma linha divisória ou linha de fronteira. Na Constituição Federal Brasileira de 1979, (Lei 6.634, de 2/5/1979) esta faixa foi estabelecida em 150 Km de

largura (110). Contudo não se pode caracterizar fronteira apenas como um lugar onde a movimentação de pessoas e do comércio são restritas à linha divisória (delimitação geográfica). A fronteira, vai além das dimensões territoriais e cartografias, na medida em que é também um lugar de passagem de múltiplos aspectos – “*econômica, social, cultural, animal, de vetores de doença, de circulação atmosférica, dentre outras*” (111-116). Não se pode limitar o conceito de fronteira atribuindo apenas a separação de dois territórios até por que se trata de um local onde circulam pessoas que podem permanecer ou se distanciarem desse lugar ou linha (114).

Desta forma, a dinâmica espacial dos espaços fronteiriços acaba por estabelecer relações que se aproximam e que se distanciam, gerando, portanto, relações harmônicas e conflituosas (115). Essa dinâmica pode ser tipificada em “modelos de interação fronteiriça” em torno do comércio no circuito das cidades gêmeas. Há cinco modelos dessa interação descrita por Cuisinier-Raynal e colaboradores (2001) e adaptado para as fronteiras do Brasil por Machado e colaboradores (2005):

Margem – as populações desse lugar estabelecem pouco contato entre si, ocorrem trocas familiares e pequenos comércios que se limitam a linha de fronteira, denominado de “comércio formiga” ou comércio localizado; **Zona-tampão** - pode ser definida como zona de estratégias ou de segurança onde há proibição de circulação de produtos ilegais, ou restrição do acesso, por exemplo, reserva naturais protegidas, parques e terras indígenas; **Frente** – tem por característica o comércio fronteiriço ilegal, por isso, o fluxo de garimpeiro é intenso e a presença dos contentores ou órgãos de fiscalização e segurança está concentrada na linha de fronteira, embora, o produto dessa atividade ilegal se expanda para os municípios localizados nas faixas de fronteira. Em Roraima essa frente além de se caracterizar pelo comercialização do ouro, há também o comércio ilegal de combustível vindo da Venezuela; **Capilar** – a dinâmica ou o comércio é muito semelhante ao perfil dos atores e do comércio de margem, porém se diferem devido à reduzida presença dos contentores, ou seja, menos estado, portanto, menos fiscalização, fato que deixa livre a mobilidade dos difusores (indivíduos) que se movimentam levando e trazendo mercadorias de um lado para o outro. Em Roraima essa característica capilar remete aos municípios localizados na linha de fronteira, com fiscalização esporádica em operações realizadas pela Polícia Federal com cooperação com o Exército; **Sinapse** - o comércio no local é facilitado ou organizado ostensivamente pelo estado por meio de investimento de pontes, estradas ou melhorando a infraestrutura das cidades gêmeas com investimento em hotelaria e

transporte etc. Em Roraima, a revitalização da BR 174 entre Brasil e Venezuela e a BR 401 que liga Brasil e Guiana, a construção da ponte entre o município de Bonfim no Brasil e Lethem na Guiana, são exemplos dessa interação por sinapse (117, 118). Esse entendimento das interações de fronteira pode ser determinante para processo de intervenção e redução da malária em zonas de fronteira. Nesse sentido, Roraima está localizada numa região malárica em complexa interação entre pessoas de várias procedências e por diversos interesses que retratam um lugar de intensa movimentação que em certa medida, essa intensidade de pessoas ciculando nesse espaço revela uma fragilidade no controle da malária que deve ser percebida como um problema de fronteira.

2.7 Geoprocessamento como ferramenta de análise espacial

Geoprocessamento é um recurso tecnológico utilizado para “coleta, exibição e tratamento de informações espacializadas” (119, 120). Também é definido como uma tecnologia que se utiliza de modelos matemáticos para processar, analisar e socializar informações espaciais (119, 120). O processamento dessas informações se dá por meio de “cartografias, assessoramento remoto, sistema de posicionamento global (GPS) e o Sistema de Informação Geográfica (GIS) (121). Estas ferramentas são bastante utilizadas em várias áreas do conhecimento, como nas cartografias para os recursos naturais, transporte, comunicação, saúde, energia, planejamento urbano e várias outras ou áreas de riscos (119).

Desde do século XVIII, com o surgimento das topografias médicas, que na verdade se tratavam de narrativas descritivas da geografia física (estudava a dinâmica e superfície terrestre) e humana (analisava as relações entre sociedade, economia e política) no período colonial, tenha já nessa época surgido o conceito de geografia médica ou da saúde, mais tarde definido como geografia médica por Max Sorre, em 1933 (122). À época, o objeto de estudo da geografia médica era analisar as doenças locais e se havia ocorrência dessas mesmas doenças em outras regiões e na diversidade da raça humana. Ou, num segundo momento, estudar outras doenças em diferentes raças e a partir do estudo elaborar uma espécie de protocolo universal (123).

A geografia médica teve várias mudanças no seu objeto de estudo, porém, só após a Organização Mundial de Saúde ampliar o conceito de saúde, tanto a geografia humana quanto a médica, passaram a inserir a desigualdade social como determinante de saúde. Foi nessa década que se concretizou o conceito de geografia da saúde no âmbito da

geografia humana, fixando como disciplina na década 1990 (124). Entretanto, há uma distinção entre geografia médica e da saúde, diferenciada apenas pela perspectiva metodológica de se analisar um fenômeno. A geografia médica se baseia no modelo biomédico quantitativo, enquanto os aspectos sociológicos e qualitativos compõem a base do modelo usado pela a geografia da saúde (125). Essa última estuda a espacialidade dos determinantes sociais, ambientais e as condições de saúde da população.

Atualmente, a geografia da saúde já está incorporada no currículo universitário, tanto nos cursos de geografia como em saúde pública, ou em cursos de pós graduação, condição importante para o aperfeiçoamento das tecnologias da análise espacial e geoprocessamento em saúde. Ferramentas importantes para analisar os fenômenos da saúde num determinado território e suas variações espaciais que, na maioria das vezes, se utiliza um mapa para transcrever em pontos e linhas tais fenômenos. Assim o mapa é o principal recurso da geografia em saúde, pois, é ele que mostra esses fenômenos observados nos territórios. Por se tratar de uma representação gráfica do território numa superfície plana, acaba por ser uma ferramenta de visualização para ajudar na interpretação da descrição do fenômeno. Por exemplo, compreendendo as relações dos atores nas epidemias, retratados na tríade ecológica, que mostra o equilíbrio entre o meio ambiente, o hospedeiro e o agente e o desequilíbrio dessa relação que pode produzir doenças (Fig. 6) (121,125).

Figura 6 - Tríade ecológica

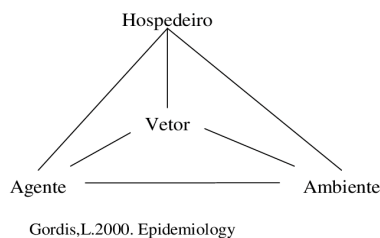
Período pré-patogênico

Hospedeiro **Tríade epidemiológica das doenças**

- Idade;
- Sexo;
- Estado civil;
- Ocupação;
- Escolaridade
- Características genéticas
- História patológica pregressa
- Estado imunológico
- Estado emocional

Agente

- Biológicos (microrganismos)
- Químicos (mercúrio, álcool, medicamentos)
- Físicos (trauma, calor, radiação)
- Nutricionais (carência, excesso)



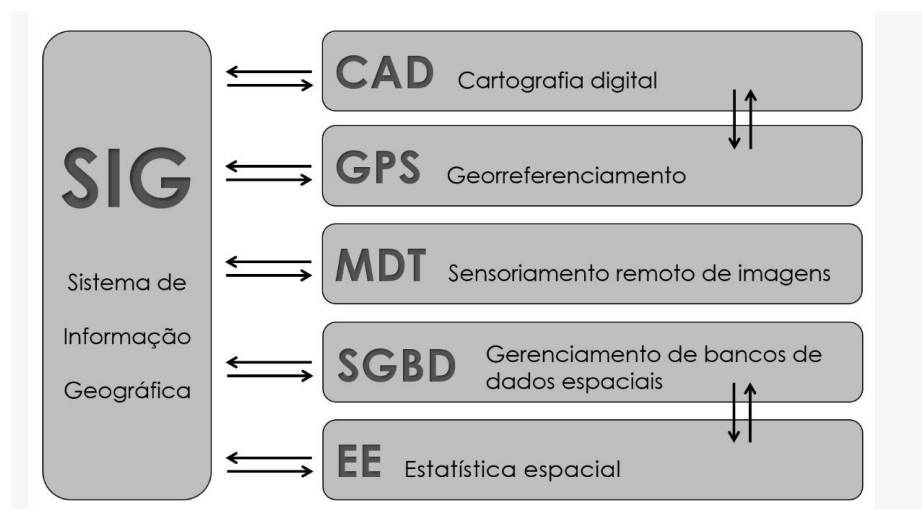
Ambiente

- Determinantes físico-químicos (temperatura, umidade, poluição, acidentes)
- Determinantes biológicos (acidentes, infecções)
- Determinantes sociais (comportamentos, organização social)

Fonte: Faculdade de Medicina do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ

Além do mapa, há várias outras ferramentas utilizadas na construção das análises espaciais que compõem as etapas do geoprocessamento, como pode ser observado na figura abaixo:

Figura 7 -Ferramentas de geoprocessamento



Fonte adaptado do Ministério da Saúde 2007

Essas ferramentas são muito utilizadas na gestão municipal, por exemplo, nas ações de planejamento urbano, onde é possível por meio do GIS mapear os postos de saúde, associar com os números de moradores do entorno do posto para delimitar a cobertura amplamente utilizada na estratégia saúde da família. Ainda na saúde pública, essa ferramenta é usada para mapeamento de epidemias e surtos, possibilitando delimitar a área e realizar bloqueio (121). Além de várias aplicabilidades em outras áreas tais como: cadastro imobiliário para planejamento urbano, no meio ambiente para monitoramento de regiões remotas, áreas de risco, queimadas, desastres ambientais, desmatamentos e no estudo de impacto ambientais: na construção de barragens, hidrelétricas, produção agrícola *versus* utilização de defensivos agrícolas, dentre outras (121).

2.8 Proteína Circunsporozoíta (CS)

A CSP é a proteína predominante na membrana do esporozoíta com função importante quanto à motilidade e invasão dos hepatócitos e devido à sua abundância, localização na superfície e imunogenicidade, tem papel fundamental na invasão da célula alvo do parasito e, por essas razões, a CSP é a principal molécula para o desenvolvimento

de vacina contra *Plasmodium*. Uma vacina eficaz nesse estágio pode reduzir infecções primárias e impedir o estabelecimento de hipnozoítos de *P. vivax*, reduzindo, assim, o risco de múltiplas recaídas que contribuem para a manutenção da transmissão (126-129).

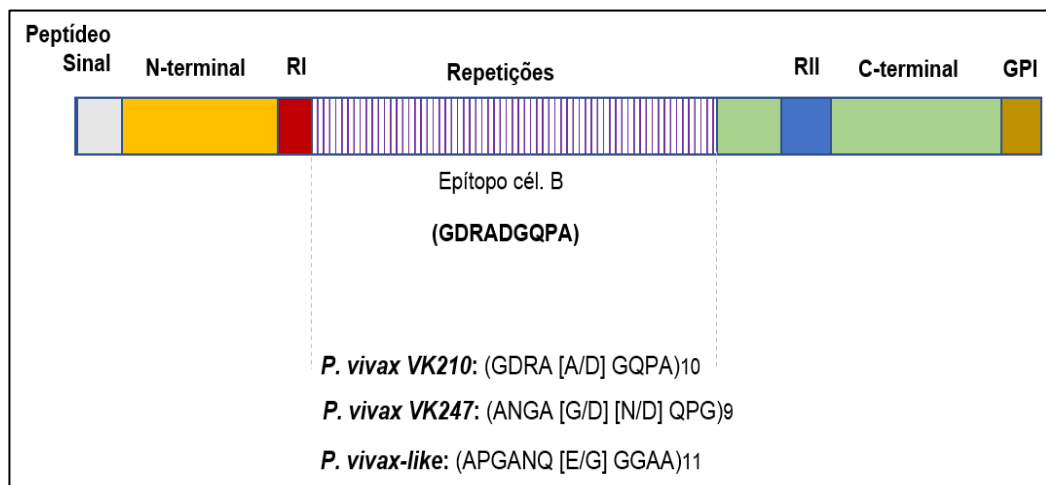
Experimentos anteriores já mostravam que a imunidade protetora na malária em humanos poderia ser induzida através da imunização com esporozoítos atenuados por irradiação ou ainda enfraquecidos por meio do uso da cloroquina num esquema profilático que permitia a inoculação de esporozoítos sem danos para o homem. Portanto, a resposta imune estimulada por tais esquemas, era capaz de inibir o parasito na circulação antes que ele produzisse a doença (130). A resposta imune humoral de indivíduos protegidos por esse esquema de imunização, mostra a presença de anticorpos específicos para a proteína circunsporozoíta (CS) o que revela um antígeno em potencial na indução da resposta protetora tanto em animais como em humanos (131).

A estrutura genética da CSP interfere na efetividade da resposta protetora do sistema imune, contribuindo para continuidade da transmissão em função da sobrevivência do *Plasmodium* em virtude da resposta do sistema imune (132). A diversidade antigênica ou variações do *Plasmodium*, principalmente o *P. falciparum*, mostra o quanto esse parasito é capaz de continuar seu ciclo no hospedeiro humano mesmo diante das respostas imunogênicas (133).

A proteína CS é uma molécula multifuncional e estruturalmente essencial para a formação, maturação, motilidade e desenvolvimento do esporozoíto nas várias fases do seu desenvolvimento durante o processo de migração desde a invasão das glândulas salivares do mosquito até a entrada nas células hepáticas do hospedeiro humano (134-136). Possui baixo peso molecular (58 kDa) e apresenta uma estrutura altamente conservada nas diferentes espécies plasmodiais. A Figura 8 mostra a estrutura da proteína CS constituída por um domínio N-terminal, uma região de repetição central localizada entre duas regiões conservadas, região I (RI) e região II (RII), e uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) fixada no extremo C-terminal (137). Na região de repetição central, encontra-se os epítipo de células B imunodominantes alvos de anticorpos protetores enquanto as regiões N e C (terminal) contêm epítipos de células T-CD4 e CD8, reconhecidos por células T na resposta citotóxica e auxiliar. O domínio repetitivo central possui número variados de repetições em “tandem” e as extremidades amino e carboxila altamente conservadas. As sequências em tandem no domínio central são específicas para cada espécie plasmodial, apresentando-se conservadas para o *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. brasilianum* (138).

Contudo, para o *P. vivax*, essa sequência apresenta três variantes de acordo com a composição de aminoácidos das repetições. A variante VK210 do *P. vivax* é a mais amplamente distribuída em regiões endêmicas de malária por *P. vivax* e predomina em muitas delas, enquanto a VK247 é limitada a algumas regiões, principalmente, em regiões com presença de infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*, incluindo o Brasil (139). No entanto, o tipo VK247 é mais comum no Sudeste da Ásia do que em outros países (139). O terceiro tipo de unidade de repetição, chamado *P. vivax-like*, é idêntico ao descrito para *P. simiovale*; sua frequência global ainda é pouco conhecida, mas já detectado em Papua Nova Guiné, Brasil, Indonésia e Madagascar. No Brasil, os parasitos *P. vivax-like* foram identificados em diversos estados Amazônicos, inclusive em infecções mistas com outras variantes do tipo VK e em área endêmica pré-Amazônica, no estado do Maranhão (140,141).

Figura 8 -Estrutura da proteína circunsporozoíta



Fonte: Pereira (2018)

3. JUSTIFICATIVA

A incidência da malária na Amazônia brasileira teve uma expressiva redução na última década com o número de casos registrados caindo pela metade, entretanto, nas áreas da fronteira internacional as ações de controle não tiveram o mesmo êxito. A malária continua a crescer nos municípios fronteiriços, exigindo uma análise mais aprofundada da relação entre a situação de fronteira e a transmissão deste agravo. A malária no Estado de Roraima é caracterizada pelos altos registros de casos importados da Venezuela e Guiana. A capital, Boa Vista, localiza-se a aproximadamente 100 km distantes da Guiana e 200 km da Venezuela. Apesar desse município ser considerada área de baixo risco de transmissão de malária, os numerosos registros de malária importada e a crescente pressão de infecção sobre os municípios de fronteira e na capital, representam um grande desafio para a organização do serviço de vigilância em saúde.

O trânsito de pessoas e vetores na fronteira e a falta de acesso às medidas preventivas e cuidados de saúde nestes países comprometem o controle da malária em Roraima, e tornam os municípios fronteiriços e a capital vulneráveis aos surtos de malária e epidemias. Além disso é preocupante a circulação de *P. falciparum* importados dos países vizinhos, resistentes aos fármacos utilizados para o tratamento da malária no Brasil. Além disso, não há estudo sorológico nem diagnóstico molecular em Roraima.

Em face do exposto, é relevante os estudos que visem caracterizar o padrão epidemiológico da malária autóctone e importada no estado de Roraima que podem auxiliar na elaboração de estratégias que considerem as especificidades das áreas de fronteiras e dos movimentos da população dos países fronteiriços nos municípios do Estado de Roraima.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar o padrão epidemiológico da malária autóctone e importada no estado de Roraima com base nas condições de receptividade dos municípios com maior número de casos importados.

4.2 Objetivos específicos

- Descrever a evolução espaço temporal dos casos de malária autóctones e importadas, notificada em todos os municípios do estado de Roraima, utilizando dados retrospectivos extraídos do SIVEP no período de 2009 a 2018;
- Determinar as espécies de plasmódios circulantes e a presença de anticorpos específicos para a proteína CS na população dos municípios de Boa Vista, Pacaraima, Rorainópolis e São João da Baliza, utilizando técnicas parasitológicas diretas, moleculares e sorológicas, no período de 2016 a 2018;
- Caracterizar os criadouros da zona urbana de Boa Vista, segundo as espécies de anofelinos, relacionando sua distribuição com a frequência de gametócitos com a malária autóctone e importada notificada nesse município no período de 2016 a 2018.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

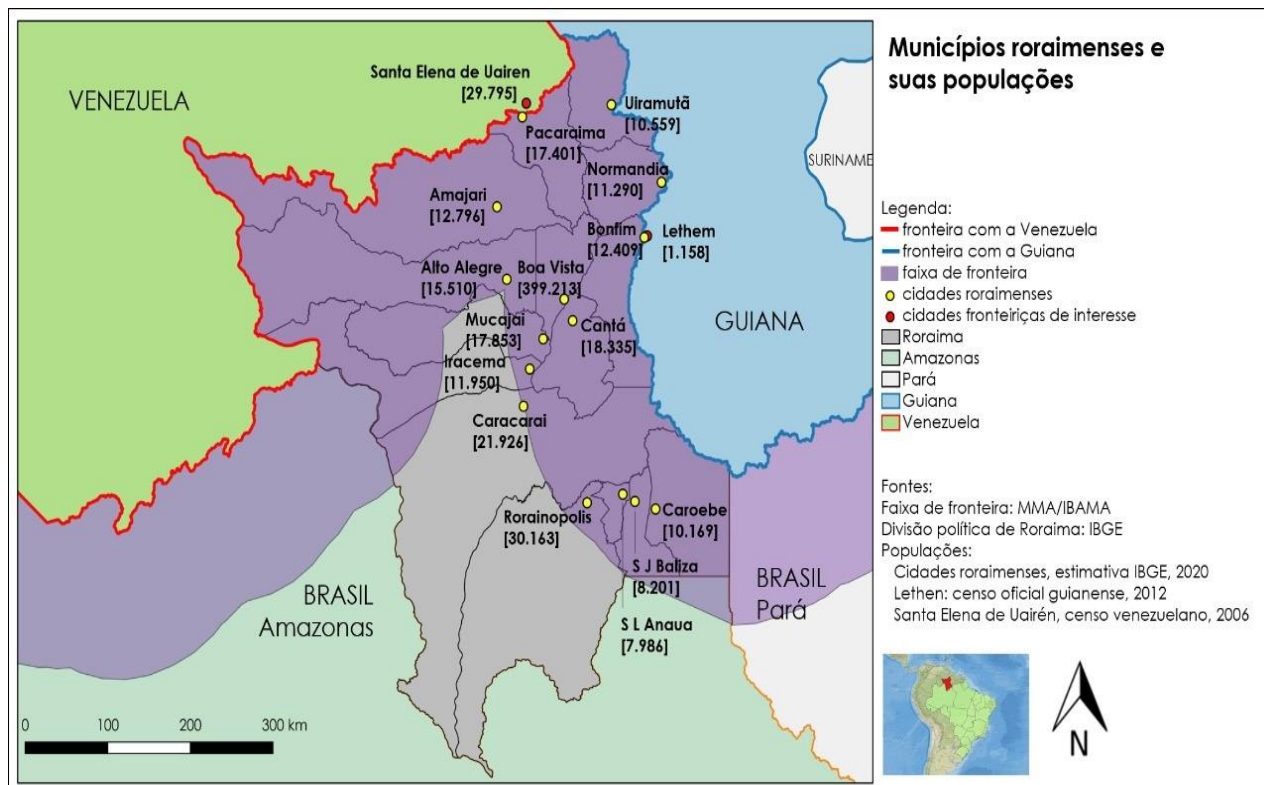
5.1 Tipo de pesquisa

Considerando os objetivos, esse estudo adota múltiplas técnicas metodológicas. É exploratório, pois nos procedimentos técnicos utilizou dados obtidos por meio de fonte secundária, que possibilitou a análise espacial e temporal de todos os municípios de Roraima, representando o primeiro objetivo específico que trata da série histórica descrita no intervalo de 2009 a 2018, portanto trata-se de um estudo retrospectivo. Outra vertente desta pesquisa é ser um estudo transversal realizado nos municípios Boa Vista, Pacaraima, Rorainópolis e São João da Baliza. Esse estudo contempla o segundo e terceiro objetivo específico realizado no período de 2016 a 2018, caracterizando como estudo prospectivo. Os dois tipos de estudos buscaram caracterizar o padrão epidemiológico da malária autóctone e importada no estado por meio de análise descritiva dos dados retrospectivos retirados do SIVEP-MALÁRIA e também pela obtenção de dados prospectivos resultantes das atividades de campo e laboratorial.

5.2 Área de estudo

Roraima está localizada no extremo norte do país ($2^{\circ}03'N / 61^{\circ}24'O$), delimitando a tríplice fronteira - Brasil, Venezuela e Guiana. Limita-se ainda, dentro do território brasileiro, com os estados do Pará e Amazonas. O estado tem sua capital, Boa Vista, como a única capital brasileira situada totalmente no hemisfério norte do globo terrestre. Seu território, com área aproximada de 224,3 mil km^2 , representa o 14º maior estado brasileiro em extensão territorial (142). Possui 15 municípios, todos com menos 20 mil habitantes, exceto, Rorainópolis, Caracará e a capital Boa Vista, essa com 284.313 habitantes (Fig 10). A população do estado, 450.479 habitantes, revela uma densidade demográfica de 1,76 habitantes por quilômetro quadrado, inseridos na faixa de fronteira. Entretanto, apenas nove têm em seu território fronteira física com a Venezuela - Alto Alegre, Amajari, Iracema e Pacaraima e com a Guiana - Bonfim, Caracará, Caroebe, Normandia e Uiramutã que faz fronteira com os dois países, conforme figura 9 (142).

Figura 9 - Mapa geopolítico do estado de Roraima



Fonte: o autor (2020)

Mesmo diante do panorama composto por diversos municípios fronteiriços, esse estudo delimitou quatro municípios por apresentarem importância epidemiológica para a malária, como se segue:

Boa Vista

Com uma população estimada, em 2019, de 399.213 habitantes, Boa Vista é a capital do estado, está localizada inteiramente no hemisfério norte, entre latitude $02^{\circ}49'12''N$ e longitude $60^{\circ}40'23''O$. Sua localização permite fácil acesso às fronteiras internacionais e ao estado do Amazonas, rota percorrida por terra. A capital fica a 231,5 km de Santa Elena do Uairén, na Venezuela (BR-174) e a 133,3 km de Lethem, República Cooperativa da Guiana (BR-401). Dista 783,0 km de Manaus, capital do Amazonas, cujo acesso também é feito por rodovia (BR-174) (142).

A cidade de Boa Vista, apresenta boa estrutura de serviço de saúde, sobretudo na assistência de alta complexidade, condição que contribui para que esse município se torne referência de saúde para todos os municípios do estado. É também o município que mais

notifica malária importada de outros países, de outros estados da federação e também da malária de procedência de outros municípios de Roraima. Em 2019, foram registrados 2.053 casos de malária, em sua maioria, procedente da Venezuela (1.558 casos), Guiana (401 casos) e com menor frequência da Guiana Francesa (13 casos) e Suriname (3 casos) (7).

O número de malária notificada em Boa Vista adquirida em outros municípios do estado, somada à malária importada provoca alta demanda nos postos de notificação de Boa Vista. Nesse mesmo ano foram registrados 4.285 casos de malária procedentes de várias regiões do estado, mostrando uma mobilidade importante entre os municípios. A malária autóctone de Boa Vista sempre foi baixa quando comparada aos demais municípios. Em 2019 foram notificados 127 casos de procedência local, mantendo o município no patamar de baixo risco de transmissão com (IPA) de 1,0 (7).

Pacaraima

Em 2019, Pacaraima teve sua população estimada em 17.401 habitantes, incluindo povos indígenas de três etnias (Makuxi, Taurepang e Wapixana) totalizando 5.838 indivíduos, o que equivale a 33,5% do total da população de Pacaraima. O município está localizado entre latitude 04°25'51"N e longitude 61°08'45"O (142). A condição de fronteira desse município, apresenta um intenso movimento de pessoas em torno do comércio entre Pacaraima e Santa Elena Uairén. Desde 2014, a cidade de Pacaraima, vem intensificando o comércio, em razão da crise econômica do país vizinho e conseqüentemente o aumento de circulação de pessoas. A malária importada notificada nesse município é quase que exclusivamente procedente da Venezuela que aumenta e diminui conforme a oferta de tratamento em Santa Elena Uairén, cidade fronteira com Pacaraima, ou conforme tensões políticas local. Por exemplo, vários conflitos na região provocaram o fechamento da fronteira incidindo na queda do número de casos de malária importada 2.136 casos em 2018 para de 268 notificações em 2019. Por outro lado, houve aumento dos casos de malária autóctone (1.577), gerando uma inversão, já que historicamente, nesse município, a malária importada sempre foi maior (7).

Rorainópolis

O município está localizado no sul do estado, entre latitude 00°56'45"N e longitude 60°25'04"O, a 298 km de Boa Vista e 487 km de Manaus. É o segundo maior município do estado, com uma população estimada em 30.163 pessoas em 2019 (142). No mesmo ano, Rorainópolis registrou 1.981 casos de malária dos quais, 1.787 foram autóctones vindo da zona rural com 1.606 (89,9%) casos contra 181 da zona urbana. Já os casos de malária importada, procedentes de outros países, apresentaram baixa ocorrência: 33 casos procedentes da Venezuela, dois da Guiana e um do Suriname. Além disso, o município notificou oito casos de malária procedentes do Amazonas, três do Pará e um de Rondônia. Somado a isso, foram notificados 149 casos de malária procedentes de outros municípios do próprio estado, fato que pode favorecer a transmissão local (7).

São João da Baliza

O município de São João da Baliza, também localizado no sul do estado, entre as latitudes 00°57'03"N e longitude 59°54'39"O, limita-se com o estado do Pará, distante a 326 km de Boa Vista. O município é escassamente povoado, com uma população de 8.201 habitantes estimada para 2019 (142). No referido ano o município notificou 634 casos de malária, 461 autóctones dos quais 310 foram adquiridos no espaço urbano do município, equivalente a 66,2%, contra 151 da zona rural. A malária importada, por sua vez, teve pouca ocorrência com apenas dois casos provenientes da Venezuela e da Guiana Francesa. Já as notificações de malária adquirida em outros municípios corresponderam a 27.1% do total de 634 notificados no município em 2019 (7).

Tanto em Rorainópolis como em São João da Baliza a malária urbana é recorrente, talvez por apresentar ambientes receptivos, já que existem criadouros na sede de ambos os municípios. Os dados de São João da Baliza e de Rorainópolis foram analisados conjuntamente devido ao reduzido número de amostras coletadas, além disso, as características epidemiológicas de ambos se assemelham: malária urbana e periurbana, baixa incidência de malária importada e grande mobilidade de pessoas entre os municípios do sul do estado onde ambos estão localizados.

5.3 População e amostra

Para a pesquisa retrospectiva considerou os indivíduos com diagnóstico de malária notificados em todos os municípios de Roraima que no intervalo de 2009 a 2018, registrou 79.538 casos autóctones e 35.322 de malária importada. Já para o estudo prospectivos, foram selecionados quatro municípios de relevância epidemiológica, tanto para a malária importada como a autóctone, com a seguinte amostragem dos participantes: Boa Vista = 520 doos quais foram identificados 26 indivíduos com gametócitos que serviram de base para a construção do mapa de calor (fig.27) com intuito de avaliar o risco de transmissão da malária nesse município; Pacaraima = 648; Rorainópolis e São João da Baliza = 161.

5.4 Procedimentos de Coleta

5.4.1 Coleta de dados retrospectivos extraídos do SIVEP-MALÁRIA

Um estudo ecológico foi realizado incluindo todos os municípios de Roraima, sob a perspectiva do local provável de infecção (autóctone e importada). Os estudos ecológicos são interessantes para analisar grupos populacionais contextualizados no tempo e no espaço, desta forma foram utilizados dados retrospectivos do período de 2009 a 2018, extraídos do Sistema de Informação de Vigilância epidemiológica (SIVEP-malária). As informações foram coletadas considerando as seguintes procedências: a malária importada adquirida fora do território brasileiro – em sua maioria são procedentes da Venezuela, seguido da Guiana e com menor frequência da Guiana Francesa e Suriname; de procedência de outros estados da federação, dentre eles o estado do Amazonas, com maior frequência, seguido do Pará e Rondônia; outros municípios do próprio estado de Roraima, em razão da mobilidade dos indivíduos, o município de notificação não é o mesmo do local provável de infecção; além da malária adquirida no próprio município analisado, pelo índice parasitário anual (IPA). Desta forma, com base nos dados secundários extraídos nesse sistema, uma série histórica foi construída tendo como recorte temporal o ano de 2009, estabelecendo um intervalo de dez anos, finalizado em 2018.

Esse sistema, apresenta três possibilidades de acesso para a extração das informações: [I] estratificação municipal, permite acesso individual de cada município; [II] estratificação estadual, as informações são disponibilizadas em bloco, ou seja, não há separação por município; [III] extrato federal que disponibiliza dados de todos os estados do Brasil. Com o intuito de descrever a distribuição espaço temporal da malária no estado,

optou-se por avaliar os dados a partir da estratificação por município. Dentro do nicho municipal foram coletados de forma separada, os registros da malária autóctone (IPA) e da malária importada, considerando alguns indicadores de impacto: positividade; espécie; local provável de infecção, fragmentado por procedência de outros países, de outros estados da federação e notificação ocorrida em outros municípios de Roraima; por gênero; faixa etária; ocupação.

A escolha em fazer análise por município se deu pela importância geográfica de alguns municípios no contexto epidemiológico que envolve seu espaço fronteiriço, já que Roraima apresenta uma extensa faixa territorial de fronteira internacional com implicação epidemiológica importante. Embora a população seja pequena na maioria dos municípios, a dispersão territorial na qual essa população se encontra é um complicador, considerando o acesso e a dinâmica que envolve as ações de malária, principalmente na zona rural e área indígena, condição que pode interferir nos indicadores de impacto de saúde.

Trata-se, portanto, de uma análise de natureza retrospectiva e descritiva de modo a caracterizar o perfil demográfico e epidemiológico da população afetada pela malária tanto importada quanto autóctone notificada nesse intervalo, inicialmente analisada num panorama geral e sequencialmente estratificado por município.

5.4.2 Coleta de dados prospectivos nos municípios de Boa Vista, Pacaraima, Rorainópolis e São João da Baliza no período de 2016 a 2018

Por motivos distintos esses municípios apresentam características importantes para o cenário da malária no estado, razão pela qual foram escolhidos como local de estudo. Em Boa Vista foi escolhido o posto Pintolândia, localizado na Policlínica Cosme e Silva, que notificou o maior número de casos, sendo uma importante referência de diagnóstico e tratamento para os garimpeiros e suas famílias. No município de fronteira Pacaraima, o maior número de notificação foi no posto de diagnóstico de malária, o único na cidade. Já os municípios de Rorainópolis e São João da Baliza pelo fato de apresentarem grande ocorrência de malária autóctone são também os municípios de alta incidência de malária urbana. Em Rorainópolis foi realizada coleta em dois postos de notificação e um posto em São João da Baliza. Além disso, foi realizada busca ativa nas residências tanto na zona rural quanto na sede de ambos os municípios.

5.5 Critérios de inclusão e exclusão

Quanto aos critérios de inclusão foram selecionados para esse estudo indivíduos que buscavam diagnóstico para malária nos postos de notificações dos quatro municípios de Roraima, além de busca ativa nos municípios de Rorainópolis e São João da Baliza. Porém, dessa tanto na livre demanda dos psotos quanto na busca ativa, foram excluídos do estudo: crianças com idade inferior a 10 anos, pessoas com distúrbios mentais, populações indígenas, presidiários, pacientes em quadro clínico de malária grave ou que tivessem indicação de internação, além de parturientes e gestantes.

Somente após ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), disponibilizado em português e espanho, os selecionados puderam participa da pesquisa (Anexo 1 e 2). Sequencialente a assinatura, uma entrevista era realizada para obtenção de dados sócio demográficos e epidemiológicos de cada participantes (anexo 3). Estes dados foram posteriormente armazenados no banco de dados Epi-Info (CDC, Atlanta) versão 3.2.

5.6 Procedimentos de entrevista e processamento das amostras para o estudo prospectivo

Após entrevista e assinatura do TCLE, coletava-se 5 ml de sangue por via endovenosa, utilizando o sistema a vácuo de coleta (*BD vacutainer*) em tubos contendo EDTA como anticoagulante. No momento da coleta foram confeccionadas gota espessa e esfregaço sanguíneo e alíquotas de sangue total foram impregnadas em dois cartões de papel de filtro FTA (Whatman Inc., Florham Park, NJ). Os cartões foram secos à temperatura ambiente e armazenados em sacos de plásticos com dessecante (sílica) e mantido à temperatura ambiente, enquanto a sua duplicata foi congelada a -20°C e transferida para o laboratório para análise posterior. Além da armazenagem das amostras nos cartões, uma alíquota de sangue e plasma de cada indivíduo foi armazenada a -20°C até o momento do uso para testes moleculares e sorológicos. Esse material processado e analisado constitui a base para responder o segundo objetivo dessa pesquisa que busca determinar quas espécies plasmodiais ciculam nesses municípios.

5.7 Análise espacial dos casos de malária e dos criadouros do município de Boa Vista no período de 2016-2020 para o estudo prospectivo

A técnica de análise espacial foi utilizada apenas para analisar os dados de malária notificados no município de Boa Vista, conforme descrita no artigo *“The impact of imported malaria by gold miners in Roraima: characterizing the spatial dynamics of autochthonous and imported malaria in an urban region of Boa Vista”* (Anexo 4).

5.7.1 Espacialização dos dados pelo Sistema de Informação Geográfica (SIG)

Para a realização da espacialização, os dados foram gerados a partir das coordenadas resultantes dos endereços dos entrevistados adquiridas pelo serviço de localização geográfica da plataforma digital Google Maps - É um programa de sistema geográfico que tem o código aberto com acesso a Licença Pública Geral, permitindo visualizar, criar, editar, analisar dados para elaboração de mapas. Os endereços foram armazenados em uma planilha para alimentar o banco de dados geográficos contendo a localização dos casos positivos e sua correlação com o ambiente geográfico. Os dados foram processados no programa Quantum Gis, ambiente de gerenciamento de dados espaciais, no Laboratório de Métricas da Paisagem do Departamento de Geografia da Universidade Federal de Roraima (UFRR), que disponibiliza imagens de satélite e bases cartográficas para a elaboração de mapas temáticos.

Na construção dos mapas (Fig. 2 e 3 do artigo - Anexo 4) foi utilizada a estrutura de correlação espacial que melhor descrevesse os dados. Para tanto, foi realizado o geoprocessamento dos criadouros, por meio de pares de coordenadas geográficas obtidas por aparelho de GPS, e sua condição de proximidade dos endereços dos pacientes, obtidos por extração manual do par de coordenadas quando da extração do endereço na plataforma Google Maps. Como parâmetro de contiguidade que estabelece a relação foi utilizado o raio de um quilômetro considerando o criadouro como centro da circunferência. Desta forma, foram traçadas as áreas (*buffers*) que geraram o risco da correlação entre criadouros e pacientes, possibilitando a análise espacial do risco de transmissão decorrente da malária importada circulante, em especial, na zona oeste de Boa Vista. Região com ampla presença de criadouros.

5.7.2 Mapeamento dos criadouros e coleta de larva na zona urbana de Boa Vista

O mapeamento dos criadouros naturais e artificiais, de formas imaturas dos vetores em toda área investigada, foi feito em campo utilizando o Sistema de Posicionamento Global (GPS) e o processamento das imagens de satélite, utilizando o software Erdas 8.1 juntamente com ArcGis 10, para a análise espacial das diferentes bases de dados georreferenciadas e construção de modelos e mapas.

Vinte e três criadouros foram identificados e georreferenciados usando o GPS Garmin por técnicos do serviço de entomologia da Coordenação Geral de Vigilância Sanitária de Roraima. Os criadouros foram escolhidos com base na localização de casos autóctones em anos anteriores. Esses criadouros foram monitorados pelo serviço de entomologia da Coordenação Geral de Vigilância Sanitária a cada dois meses, entre 2017 e 2018, e apenas qualitativamente classificados como positivos ou negativos para a presença de larvas de *Anopheles* spp. As coletas de larvas foram realizadas por meio de conchas entomológicas padrão (BioQuip, Ranch Dominguez, CA, EUA). Em cada local de criação, foram realizados nove escopos, três a direita, três a frente e três a esquerda, seguindo o padrão do Ministério da Saúde (143). Devido à grande dificuldade em criar as formas imaturas de *Anopheles* em laboratório, até a fase adulta, as larvas de 1º e 2º estágios foram usadas para determinar se o local de criação era positivo para *Anopheles* spp. As larvas (terceiro e quarto estágios) e os adultos foram identificados com as chaves de “Consoli e Lourenço-de-Oliveira e Forattini” (57,143, 144). As larvas coletadas foram transferidas para sacos plásticos entomológicos, rotulados com o código do criadouro, data da coleta e nome do coletor. Todo o material coletado foi transferido para o laboratório estadual de entomologia da Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde (CGVS) do estado de Roraima para ser rastreado e identificado. O criadouro foi considerado positivo se em pelo menos uma coleta por ano apresentasse larvas de *Anopheles* spp.

5.8 Procedimentos laboratoriais

O exame de microscopia (gota espessa) foi realizado no próprio posto de coleta pela equipe saúde da Secretaria Municipal de Saúde dos municípios de Boa Vista, Pacaraima, São João da Baliza e Rorainópolis. O resultado era imediatamente informado ao paciente.

Posteriormente, um colaborador do projeto realizava a leitura da nossa lâmina coletada no momento da entrevista. Já o estudo molecular foi realizado no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta (EUA) e a sorologia no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) no Rio de Janeiro.

5.8.1 Diagnóstico parasitológico da malária

Após coleta de campo (fig. 11), O exame parasitológico foi realizado por meio de gota espessa e/ou esfregaço sanguíneo corados pela técnica de Walker (azul de metileno e Giemsa), “Padrão ouro”, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (10). A parasitemia foi realizada a partir da técnica de gota espessa através da contagem do número de parasitos de acordo as espécies e estágios presentes incluindo gametócitos em 500 leucócitos, posteriormente ajustando para um valor final de parasitemia que leva em conta que o número médio de 6.000 leucócitos. Especificamente para o município de Boa Vista, a contagem dos gametócitos foi realizada posteriormente, tendo por finalidade a análise do risco de transmissão da malária na zona oeste da cidade de Boa Vista (contempla o terceiro objetivo específico).

Figura 10 - Busca ativa na zona rural de São João da Baliza e Rorainópolis



Fonte: o autor 2018. À esquerda confecção da lâmina (gota espessa). À direita entrevista com um dos voluntários meio de um questionário, durante atividade de campo na zona Rural do município de Rorainópolis.

5.8.2 Diagnóstico molecular

A técnica PET-PCR foi descrita por Lucchi e colaboradores em 2013 para amplificação da subunidade do gene 18S do rRNA utilizando um *primer* modificado na extremidade 5' com a adição de uma cauda universal com 17 bases de oligonucleótidos marcados com fluoróforo HEX (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*) ou FAM (gênero). O primer marcador forma um *loop* e permanece fechado na ausência de amplificação, não emitindo, portanto, fluorescência devido à proximidade de quatro bases G. A reação foi realizada em duplex para amplificação de *Plasmodium* (PET-gen) e *P. falciparum* (PET-Pf) e separadamente para *P. vivax* (PET-Pv) e *P. malariae* (PET-m). O DNA foi isolado dos cartões FTA usando um *Mini Kit QIAmp DNA* (QIAGEN, Valencia, CA), seguindo as recomendações do fabricante, conforme Tabela 2. O DNA foi eluído em 150 µL de tampão de eluição (TE -Tris HCl 10 Mm), dividido em alíquotas e armazenado a -20°C até o uso. As reações foram realizadas em um volume de 20 µL contendo, 10 µL de TaqMan 2x *EnvironmentalMasterMix* (*Applied Biosystems*), 125 nM de primer *forward* e *reverse*, e 2 µL de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador (*Agilent technologies*, *Agilent MX3005P QPCR Systems*, Santa Clara, USA). As condições da PCR consistiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por amplificação com 45 ciclos de 95°C por 10 segundos, e 60°C por 40 segundos. Os dados foram analisados no MxPro QPCR software e um valor limite de ciclos térmicos (CT) de 40 foi considerado um resultado positivo (145).

Tabela 2 - *Primers* PET-PCR utilizados

Nome do Primer	Sequência dos Primer
Genus Forward	GGC CTA ACA TGG CTA TGA CG
Genus Reverse-FAM	AGG CGC ATA GCG CCT GGC TGC CTT CCT TAG ATG TGG TAG CT
<i>P. falciparum</i> Forward	ACC CCT CGC CTG GTG TTT TT
<i>P. falciparum</i> Reverse-HEX	AGG CGG ATA CCG CCT GGT CGG GCC CCA AAA ATA GGA A
<i>P. malariae</i> Forward	AAG GCA GTA ACA CCA GCA GTA
<i>P. malariae</i> Reverse-FAM	AGG CGC ATA GCG CCT GGT CCC ATG AAG TTA TAT TCC CGC TC
<i>P. ovale</i> Forward-FAM	AGG CGC ATA GCG CCT GGC CAC AGA TAA GAA GTC TCA AGT ACG ATA TT
<i>P. ovale</i> Reverse	TTG GAG CAC TTT TGT TTG CAA
<i>P. vivax</i> Forward	ACT GAC ACT GAT GAT TTA GAA CCC ATT T
<i>P. vivax</i> Reverse-HEX	AGG CGC ATA GCG CCT GGT GGA GAG ATC TTT CCA TCC TAA ACC T

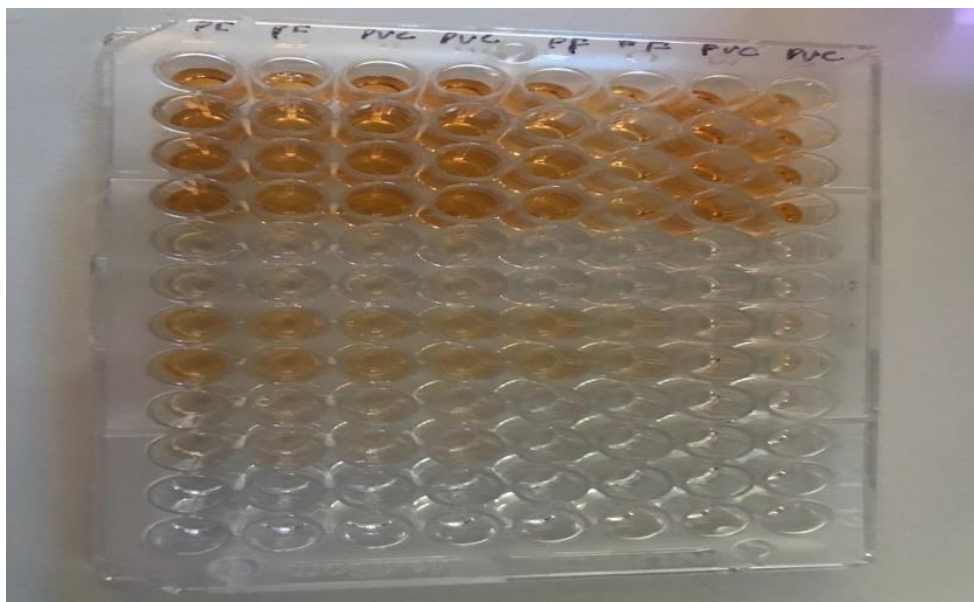
Adaptado: Lucchi, Naomi W (2020)

5.8.3 Estudo sorológico para a detecção de IgG específicos para a proteína circunsporozíta

Placas de 96 poços (*Nunc/Maxicorp*) foram sensibilizadas por 12 a 16 horas a 4°C com 5 µg/ml dos peptídeos sintéticos representando a região repetitiva da proteína CS de *P. falciparum* (NANP)₈, *P. malariae* GNDA- (GNAA)₄ e *P. vivax* VK210- (DGQPAGDRAAGQPAG) - (DRADGQPAG)₂; VK247 - ANGA (G/D) (N/D) QPG; *P. vivax-like* - APGANQ (E/G) GGAA. Após esse período as placas foram lavadas três vezes com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T com 5% de BSA (PBS-T-BSA 5%) por 2 horas à 37°C. Então, novamente as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com o plasma diluído em PBS-T-BSA 2,5% diluídos 1:100 por 1 hora à 37°C. Cada soro foi testado em duplicata. Após outras três lavagens com PBS, as placas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IgG, conjugado à peroxidase (Sigma) diluído em PBS-T-BSA 2,5% na proporção de 1:5000 por 1 hora à 37°C. Depois de mais um ciclo de lavagens foi feita a revelação das placas, a partir da incubação com solução reveladora contendo OPD (O-fenilenediamina 1-2 Benediamina – Sigma), tampão citrato-fosfato (C₆H₈O₇ e Na₂HPO₄, pH=5,0) e H₂O₂ por 3 a 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida a reação de revelação foi paralisada com H₂SO₄ 2 N. As leituras das densidades ópticas (DOs) foram realizadas a 490 nm no leitor de ELISA (Modelo Biotek ELx800) do Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz.

Em cada placa foram colocados soros-padrões reativos (controle positivo) e soros-padrões não reativos de indivíduos moradores de áreas não endêmicas de malária que nunca contraíram a doença (controle negativo). Em cada experimento foi calculada a média das DOs dos controles negativos e três desvios-padrões foram somados a esta média, obtendo-se assim o valor do *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. (fig. 11)

Figura 11 - Fase do processo de experimentos laboratoriais



Sorologia (ELISA) realizado no laboratório de imunoparasitologia do IOC/FIOCRUZ

5.9 Análise de dados

A análise estatística foi realizada com base em várias técnicas em razão da multiplicidade de associações nos resultados. Desta forma, a análise descritiva dos dados utilizou frequência absoluta e relativa para variáveis qualitativas e medidas-resumo (mediana e quartis) para as variáveis quantitativas. A comparação entre o tempo transcorrido desde a última infecção e as respostas dos anticorpos foi realizada por meio do teste estatístico (Kruskal–Wallis). Esse teste é uma análise de variância de um determinado fator que usa um método não paramétrico para estimar se as amostras têm a mesma distribuição.

Para a associação entre as diversas variáveis demonstradas por meio de gráficos e tabela com os níveis de resposta para os diferentes anticorpos para proteína (VK210, VK247, *P. vivax-like*, CS de *P. falciparum*, CS de *P. malariae*) foi utilizada análise bivariada desenvolvida através de um modelo de regressão linear simples. A associação independente (i.e. utilizando controles) entre cada covariável e os desfechos utilizou modelos lineares multivariados. Estes modelos foram ajustados pelas covariáveis que apresentaram uma associação estatisticamente significativa (p -valor $<0,05$) com o desfecho na análise bivariada. O melhor modelo foi estimado segundo os critérios de BIC e AKAIKE. Este procedimento foi aplicado para cada desfecho e cada covariável. As

estimativas apresentadas para análise univariada e multivariada apresentam o intervalo de confiança de 95%. O programa estatístico R versão 3.4.0 foi utilizado para esta análise.

Para análise dos dados retrospectivos (série histórica), o estudo considerou duas categorias de análise: malária autóctone e importada, realizada a partir da distribuição espacial e temporal, durante um período de dez anos, de 2009 a 2018. O estudo foi feito de forma global para algumas variáveis e específico por município, quando foi possível aplicar alguns testes estatísticos. Portanto, foram realizados diferentes testes nas variáveis que permitiram o grau de liberdade para a realização de testes estatísticos e, em outras situações, foi utilizada a análise descritiva. Para a variável gênero, foi utilizada a técnica do teste T; para faixa etária, ocupação e espécies foram utilizadas as técnicas do teste de Tukey e ANOVA. Frequência relativa e absoluta, média e desvio padrão também foram utilizados para interpretar alguns dados da análise descritiva.

Na avaliação espacial do município de Boa Vista foram utilizados os testes estatísticos (Kolmogorov-Smirnov e das funções espaciais – G, F, K e L), conforme descrito no artigo (Anexo 4).

5.10 Aspectos éticos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Roraima, protocolo (CAAE: 44055315.0.0000.5302).

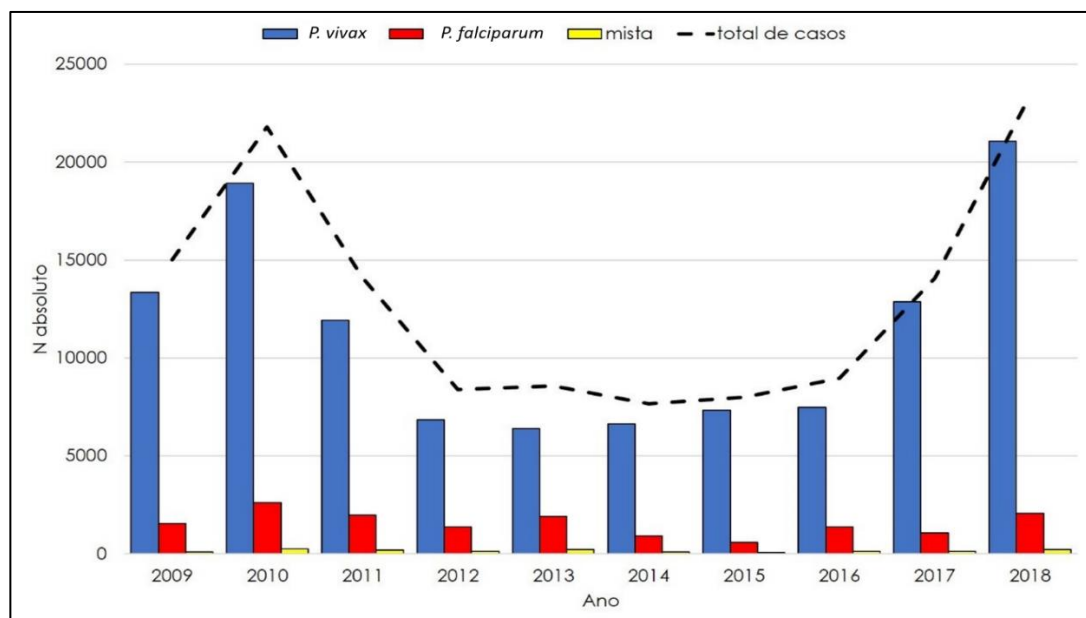
6. RESULTADOS

Os resultados a seguir descrevem alguns aspectos da epidemiologia da malária em Roraima utilizando dados secundários do SIVEP-Malária no período de 2009 a 2018 Referente ao primeiro objetivo específico.

6.1 Número de casos de malária e espécies plasmodiais no estado de Roraima no período de 2009 a 2018

A incidência da malária no estado de Roraima apresentou variações no decorrer desse período, sendo que a menor e maior taxas foram registradas respectivamente em 2014 (n=7.662) e em 2018 (n=23.369). Entre 2012 a 2016, houve uma estabilização com baixa frequência comparado a 2011 (n=14.104) e também a 2017 (n= 14.074). Em relação as espécies plasmodiais detectadas no estado, o *P. vivax* foi o mais prevalente durante todo o período de análise com médias anuais (DP 5644.7) maior do que o *P. falciparum* (DP 774.9) e a malária mista (79.35), ambas permaneceram estáveis ao longo do período, embora o *P. falciparum* tenha apresentando pequenos aumentos ao longo dos anos. Os casos de *P. vivax* foram mais frequentes ao longo do período, com aumento em 2010 (n=18.926) decrescendo nos anos seguintes e voltando a aumentar a partir de 2016, atingindo 21.066 casos em 2018. Já o *P. malariae*, em todo período, foram detectados apenas 3 casos. O teste de Tukey mostrou diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre as médias, detectando que *P. vivax* possui uma média muito maior que as demais. No entanto, ao comparar as médias da malária do tipo misto com a *P. falciparum*, não foram observadas diferenças. (Fig. 12)

Figura 12 - Casos de malária em Roraima, estratificado por espécie, 2009-2018



Mista= *P. falciparum*+*P. vivax*

6.2 Caracterização da malária autóctone e importada em Roraima

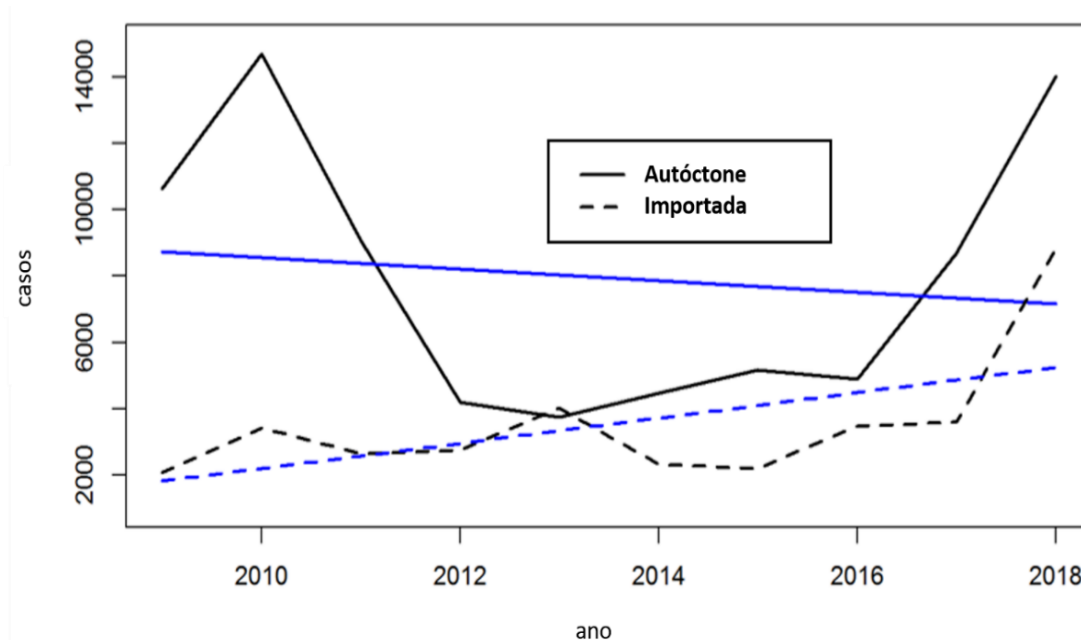
Para esta análise, o conceito utilizado de “malária autóctone e importada” segue a definição ou tipificação do Ministério da Saúde, ou seja, a malária ou é produzida dentro do município (autóctone) ou (importada) fora dele. Assim, o sistema (SIVEP) classifica a malária de duas maneiras: [I] “autóctones” quando o local provável de infecção é no mesmo município de notificação e [II] “importados” quando o local provável de infecção não é o mesmo de notificação, podendo ser de outro município, outra unidade da federação ou de outro país”. Portanto, essa forma de separação determina que toda a malária adquirida fora do município é categorizada como importada (7).

Em Roraima, nos últimos dez anos (2009-2018) foram notificados 114.860 casos de malária, dos quais 69,2% eram autóctones ($n = 79.538$); ($n = 35.322$) importados; 20,4% ($n = 7.193$) foram adquiridos em outros municípios do estado. Em relação à malária de outros países, a Venezuela foi o país que mais contribuiu com o incremento da malária importada no estado com 64,3% ($n = 17.949$), seguido pela Guiana, com 34,8% ($n = 9.705$). Os outros países, como Guiana Francesa, Suriname, Colômbia, entre outros, juntos somavam apenas 0,9% ($n = 245$) dos importados de outros países.

A média anual de casos autóctones e importados notificados em Roraima durante este período foi de 11.476 ± 5.362 , sendo 7.953 ± 4.115 casos autóctone e 3.532 ± 1.974 importados de outros estados e países, bem abaixo da média da malária autóctone. Isso mostra que, embora a incidência da malária no estado é alta quando comparada com outros estados da federação, a malária autóctone ainda é o grande problema de saúde para o estado, como se pode observar na figura 13, que mostra o número de casos de malária autóctone (linha regular) e importada (linha pontilhada) por ano em Roraima. Assim, a malária autóctone apresentou comportamento irregular ao longo do período, atingindo um pico em 2010 ($n = 14.694$) com queda significativa em 2012 e 2013. A partir de 2014, aumenta novamente, apresentando outro pico em 2018, retornando à mesma situação de 10 anos atrás, com 14.025 de casos autóctones de malária. Embora exista uma tendência de diminuição da taxa média anual de casos, esta redução não é estatisticamente significativa, ($p=0.07$).

Já a malária adquirida fora do território brasileiro permaneceu irregular e abaixo da malária autóctone em todo o período. No entanto, mesmo sendo de menor ocorrência, nos últimos anos observou-se diminuição da flutuação com tendência ascendente. Assim, em 2009 foram notificados 2.000 casos, valor que obteve gradual aumento até 2017. Em 2018, chegou-se a 9.000 casos, o maior valor em todo período. No agregado do tempo observado, a taxa média anual de casos não é estatisticamente significativa ($p=0.07$), sendo 381 casos por ano, com uma tendência de incremento de casos no intervalo. Esse período apresentou média de 2.788 ± 1.053 . Quando estratificado por país, a Venezuela teve 1.794 ± 1.121 , muito superior à média da Guiana, de $970,5 (\pm 392,70)$.

Figura 13 - Casos de malária em Roraima, por local provável de infecção do período 2009-2018.



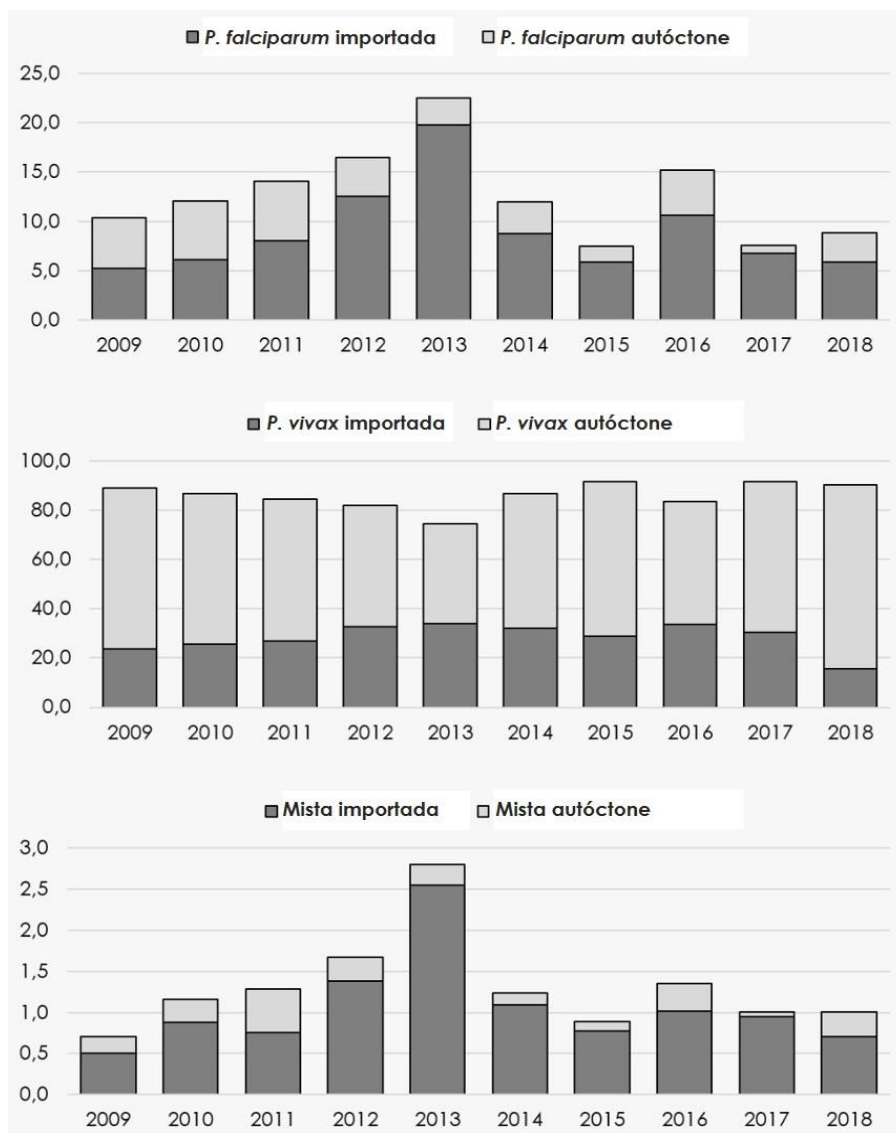
Os dados observados foram representados por linhas pretas, tanto autóctones quanto importadas. Os azuis representam a tendência temporal que mostra a taxa média anual de casos estimada pelos mínimos quadrados ordinários (MQO).

6.3 Espécies plasmodiais na malária autóctone e importada

O cálculo percentual foi realizado considerando a quantidade de casos por determinada espécie em um ano, multiplicada por cem e dividida pelo total de casos de malária no referido ano. Este mesmo cálculo foi realizado para cada espécie e local de infecção em separado. Assim, é possível observar na figura 14 que a frequência do *P. vivax* foi superior às demais espécies tanto para os casos autóctones quanto para os importados em todos os anos desse intervalo, mostrando que a malária vivax é prevalente em Roraima. Comparado a ocorrência do *P. vivax* pelo local de infecção, em geral, os casos autóctones de vivax foram maiores que os casos importados, sendo que, o *P. vivax* importado teve sua maior e menor ocorrência respectivamente em 2013 e 2018. Em relação ao *P. falciparum*, até o ano de 2011, as ocorrências entre os casos autóctones e importados mantiveram uma frequência bem próxima, contudo, a partir de 2012 observou-se um declínio na frequência dos casos autóctones, ao mesmo tempo em que os casos importados apresentaram aumento nos dois anos seguintes, estabilizando-se nos últimos cinco anos em patamares elevados. No geral, a análise do período demonstra que a maior ocorrência foi observada em 2013 para *P. falciparum* importado e em 2011 para malária por *P. falciparum* autóctone (Fig

14). Já a malária mista, independentemente do local de infecção, apresentou baixa ocorrência durante o período.

Figura 14- Distribuição dos casos de malária em Roraima segundo a espécie de plasmódio e o local de origem da infecção no período de 2009-2018



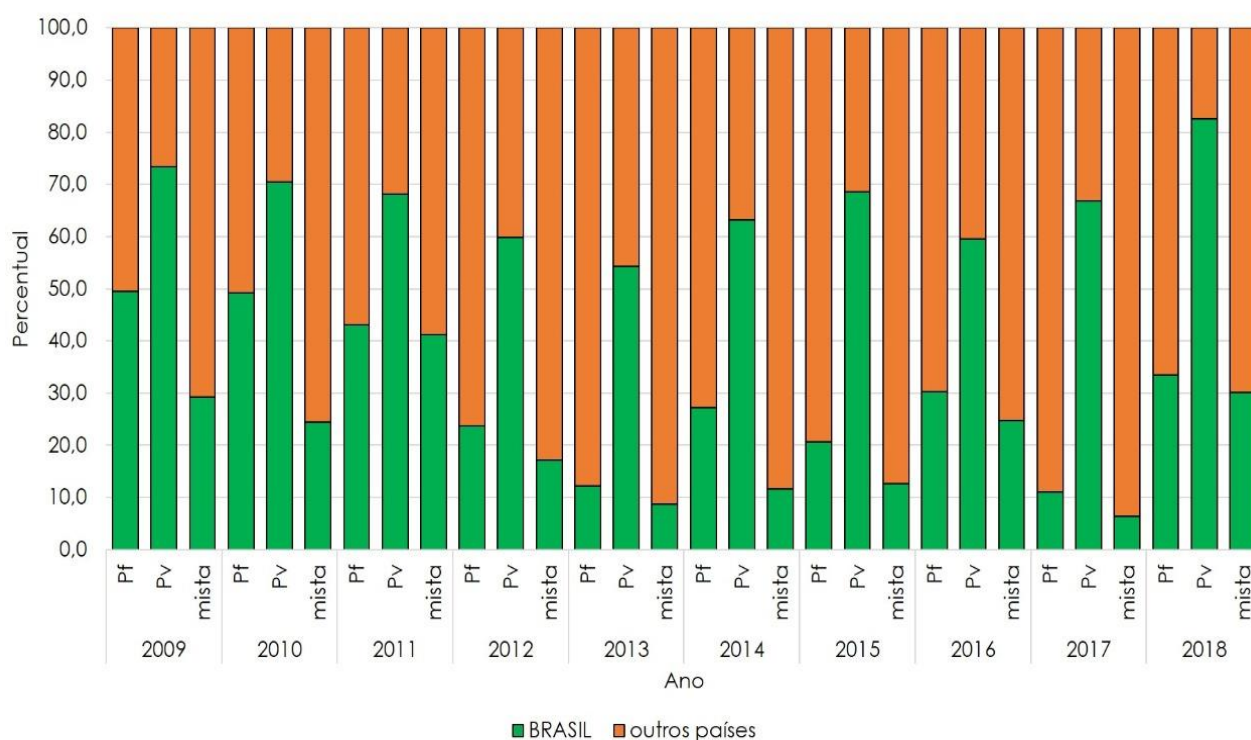
mista (*P. falciparum* + *P. vivax*)

6.4 Malária importada de outros países por espécie de Plasmódio

Os dados mostram que a malária importada de outros países, em sua maioria, é proveniente dos países que fazem fronteira com o Estado de Roraima. Em 2014, os casos importados de malária da Guiana tiveram uma redução significativa em comparação aos anos anteriores mantendo-se com baixa ocorrência nos anos subsequentes. Por sua vez, em

2010, a malária procedente da Venezuela registrou mais que o dobro de casos notificados no ano anterior, seguida por uma queda quase na mesma proporção em 2011. No ano seguinte começou a aumentar, atingindo seu maior percentual em 2018, aumento de 633,2% em relação ao ano anterior. Para ambos os países, as espécies plasmodiais apresentaram comportamentos parecidos ao longo dos anos, embora os casos de malária por *P. vivax* sejam significativamente mais frequentes que os de *P. falciparum* independentemente do local provável de infecção. Além dos dois países em questão, Roraima também registra casos de malária procedente da Guiana Francesa, Suriname e Colômbia com pouca frequência, correspondendo a 0,9% (n=245) de todos os casos importados do período estudado. (Fig. 15)

Figura 15 – Distribuição dos casos de malária em Roraima segundo espécie de plasmódio estratificado por país



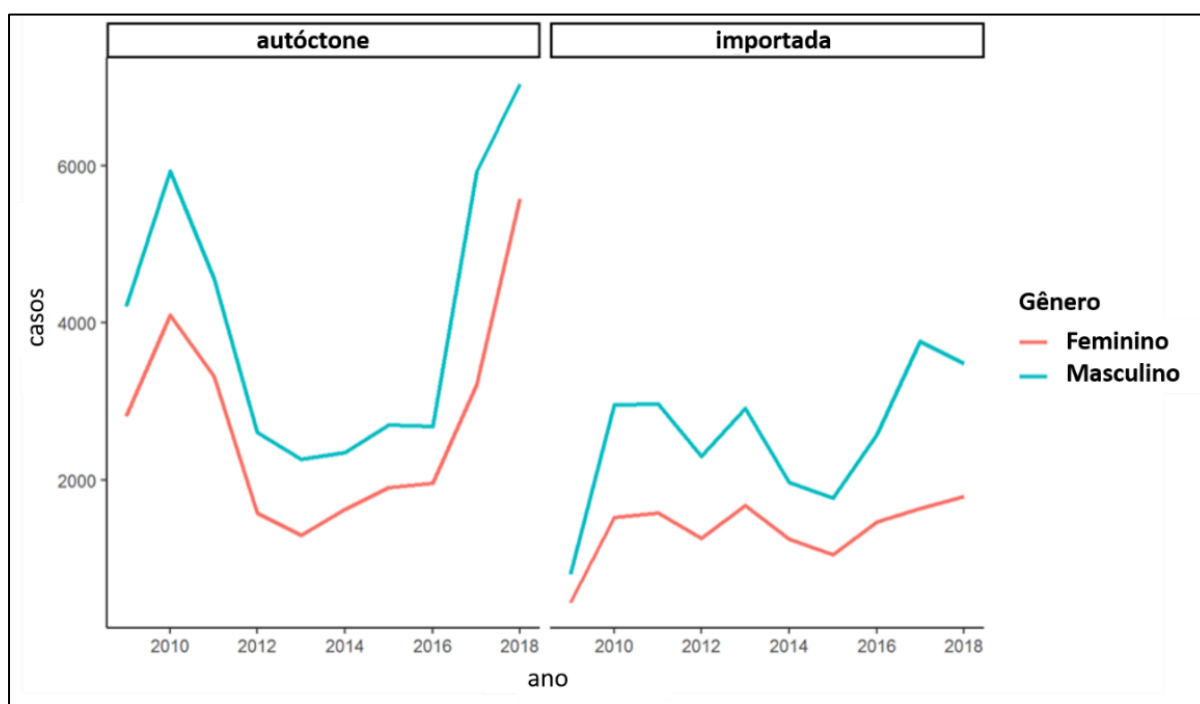
Mista (*P. falciparum* + *P. vivax*); nos outros países, estão inclusos Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Colombia, Bolívia, Peru, Chile

6.5 Aspectos sociodemográficos da malária autóctone e importada

A figura 16, mostra que no geral, a malária notificada no estado no período de 2009 a 2018, apresentou diferenças entre gênero. A análise foi realizada apenas com os dados gerais do estado e não individualmente por município nem anual, por não apresentar um

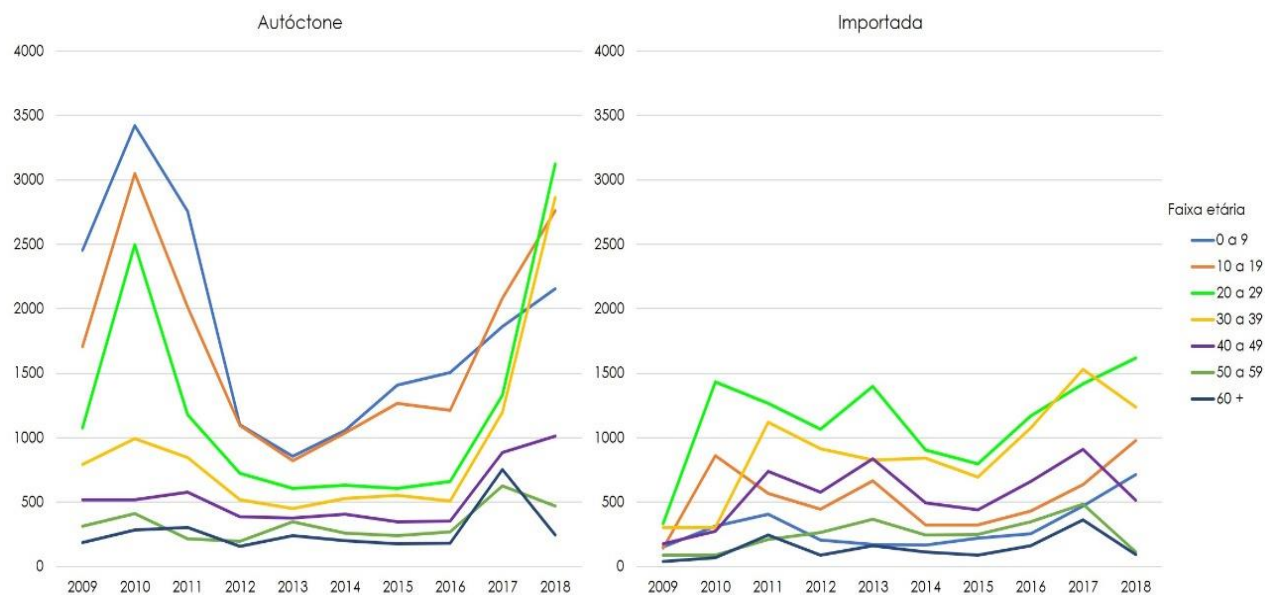
grau de liberdade para testes estatísticos. O teste t estimou que existe uma diferença significativa entre os sexos ($p < 0,02$): Independentemente do local de infecção, os homens são mais acometidos por malária do que as mulheres, assim, a média da população masculina em indivíduos com malária importada foi de ($m=2.250$), bem superior à da população feminina que apresentou média de ($m=1364$). Essa diferença também foi observada na malária autóctone sendo que a média (4028.5) na população masculina é consideravelmente maior que média de contingente de mulheres ($m=2737.4$).

Figura 16 - Casos de malária em Roraima estratificado por gênero segundo o local provável de infecção



A figura 17 apresenta casos de malária por faixa etária segundo o local provável de infecção. Em relação a idade, os casos de malária autóctone foram mais frequentes nos grupos etários mais jovens (<29 anos) atingindo essas faixas etárias com mais intensidade em 2010. Nos anos seguintes houve uma grande diminuição dessa faixa etária, porém, voltando a aumentar em 2017 e 2018. Por outro lado, os casos de malária importada foram mais frequentes nas faixas etárias de 20-39 anos. Isso mostra que a dinâmica da doença adquirida em solo brasileiro é diferente da adquirida em outros países.

Figura 17 - Casos de malária em Roraima estratificado por faixa etária segundo o local provável de infecção

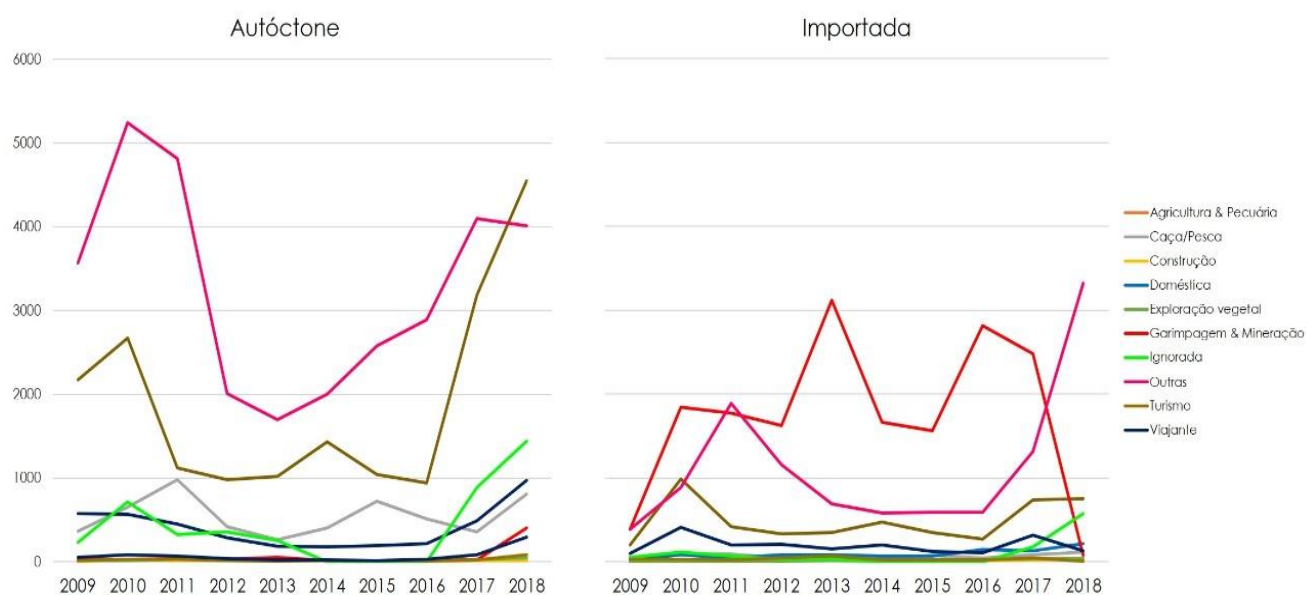


Ao analisar quais profissionais seriam mais acometidos de malária, observou-se que dentre o número de profissões catalogadas ou as ocupações declaradas nas fichas de notificações de caso do SIVEP, a categoria “outras” sobressaiam as demais ocupações (n=39.792). Essa categoria não especifica que atividade é exercida, ela representa 52,9% de todas as ocupações, seguida de agricultura (n= 20.900), equivalente a 27,8%. Em sentido oposto, chama a atenção as atividades realizadas em mineração pelo baixo número de pessoas (n= 524), causando estranheza, pois, se esperava que esse tipo de ocupação fosse elevado, dada a incidência de malária proveniente de regiões de garimpo (Fig. 18).

Quando se diferencia a ocupação pelo local provável de infecção (autóctone e importada) é possível notar que a malária autóctone foi prevalente entre indivíduos que se declararam agricultores e pescadores quando se ignora a categoria “outras” que foi a mais frequente. Já na malária importada, as ocupações tiveram distribuição semelhante com valores próximos, exceto, quando se analisa as categorias “outras” com maior prevalência. Nessas duas categorias, o SIVEP não define do que se trata, é possível que crianças estejam inclusas, por não se enquadrarem na tipificação das atividades profissionais ou ocupações contidas nas opções do formulário de “notificação de casos” do SIVEP. Além disso, indivíduos que exercem alguma atividade em mineração, possivelmente também foram

registrados nessas duas categorias, pois, há inconsistência entre a incidência de malária procedente de mineração e o número declarado de garimpeiro (Fig.19).

Figura 18 - Casos de malária em Roraima estratificado por ocupação segundo o local de infecção



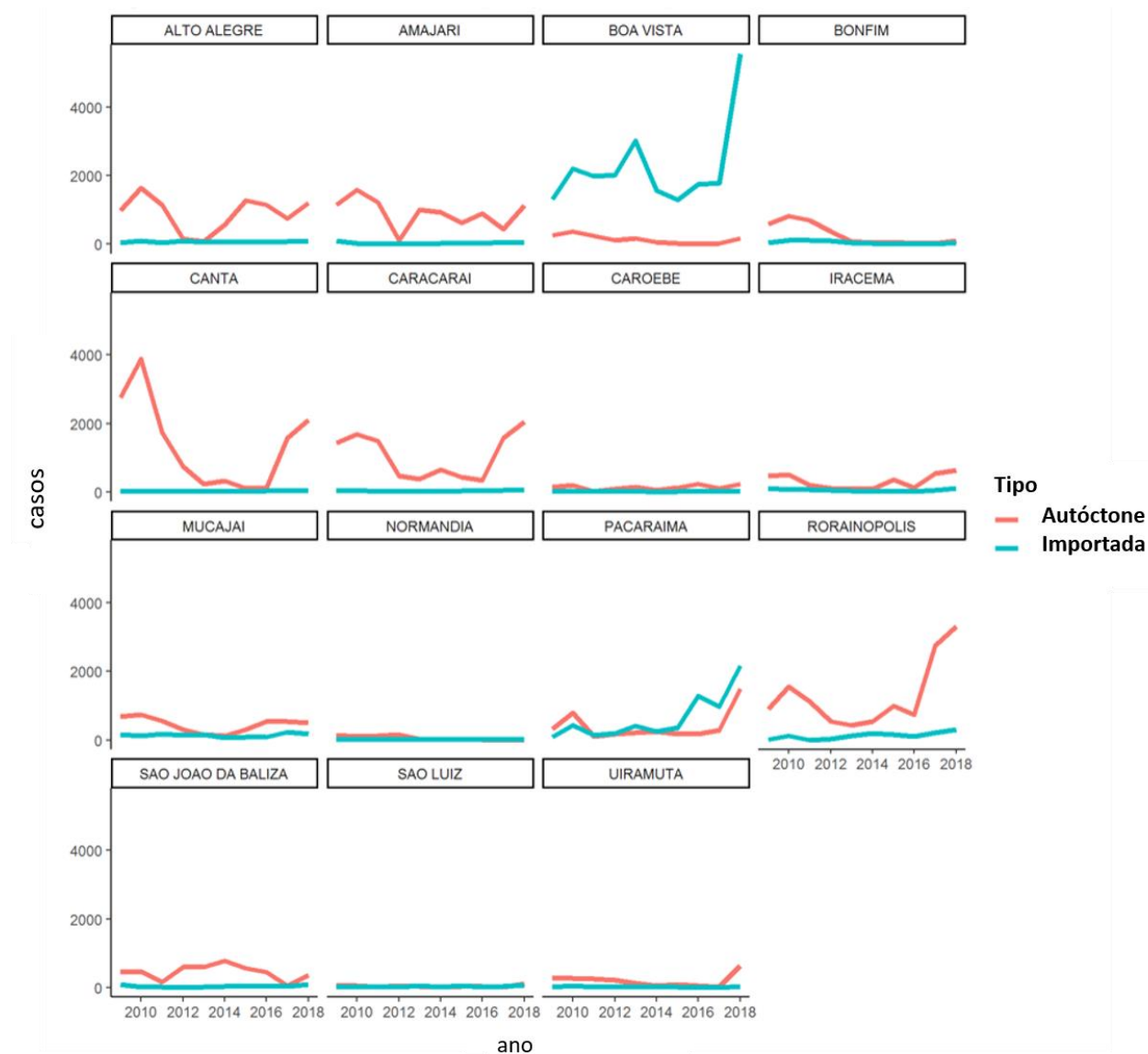
6.6 Distribuição da malária autóctone e importada nos municípios de Roraima

A Figura 19 apresenta um gráfico linear para cada um dos municípios de Roraima, contendo o número de casos de malária de acordo com o provável local de infecção, no período de 2009 a 2018. No período estudado, os dados mostram que a malária é endêmica na maioria dos municípios do estado com maior expressão dos casos de malária autóctone do que importada, exceto, o município de Boa Vista, onde a malária importada foi maior durante todo o intervalo e em Pacaraima que, a partir de 2011, a malária importada passou a contribuir com um maior número de casos. A maioria dos municípios apresentou flutuações nos episódios de malária autóctone, a exemplo do município de Cantá que em 2010 apresentou seu maior índice, seguido de queda acentuada em 2012 estabilizando-se em baixa nos anos subsequentes. Porém, em 2016 foi registrado um pico. Já outros municípios apresentaram números de casos constantes durante todo o período, dentre eles Caroebe, Normandia, São Luiz e Uiramutã, municípios, onde a malária autóctone sempre se mostrou com baixa frequência. Bonfim, município que faz fronteira com a Guiana, é um caso interessante, pois, apresentou pouca flutuação no decorrer do período. Seu maior

índice foi registrado em 2010 e nos anos seguintes apresentou tendência de queda, estabilizando com baixa frequência até 2018.

A malária importada também apresentou poucas flutuações ao longo do período além de baixa ocorrência entre os municípios com exceção de Pacaraima e Boa Vista. Porém, o município Pacaraima, além de manter-se com números altos de casos, apresentou um aumento ainda maior em 2018. Já em Boa Vista, a malária importada variou ao longo dos anos, com um pico em 2012, nos anos seguintes se manteve oscilante, mas com tendência de elevação, apresentando, em 2018 um aumento extraordinário.

Figura 19- Distribuição dos casos de malária por municípios de acordo o local provável de infecção



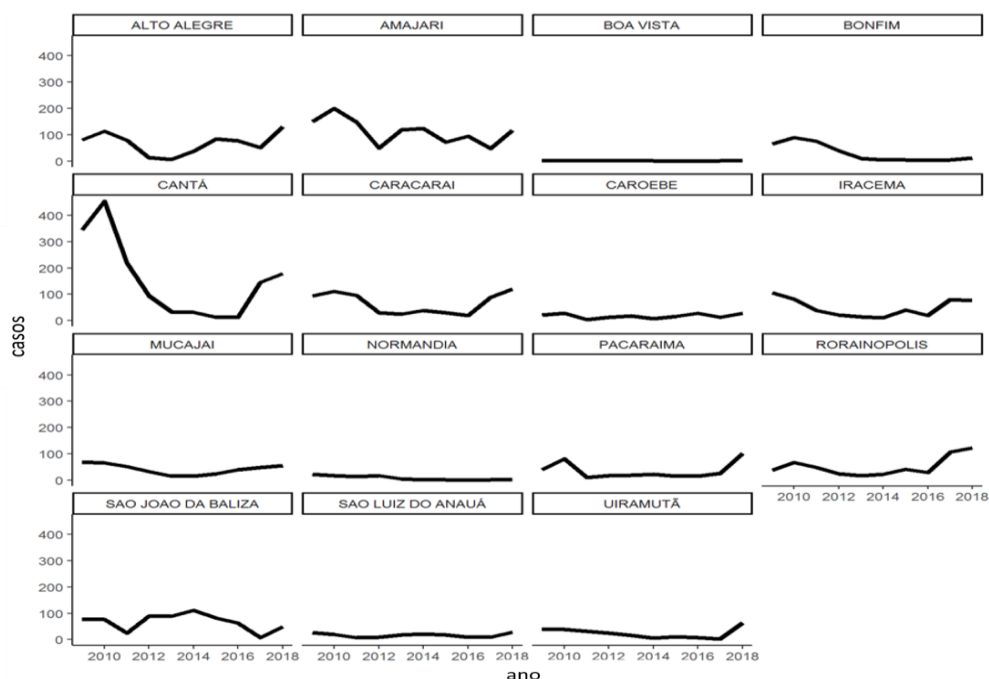
6.7 Risco de Transmissão da malária nos municípios

A distribuição do Índice Parasitário Anual (IPA) por município, representa a malária autóctone no período de 2009 a 2018. A maioria dos municípios apresentou variações nos níveis de risco de transmissão. Durante todo o período, Boa Vista, São Luiz e Normandia foram os únicos municípios que não se enquadraram no estrato de alto risco de transmissão. Por sua vez, o município de Amajari em todos os anos foi classificado nessa modalidade, exceto em 2017 que apresentou risco moderado de transmissão (fig. 20).

De 2013 a 2016, alguns municípios, como Cantá, Caracarái, Caroebe, Iracema, Mucajaí, Normandia, Pacaraima e Rorainópolis, conseguiram modificar ou baixar o estrato de alto risco apresentado nos anos anteriores para moderado risco de transmissão.

Em relação à modalidade de risco moderado de transmissão, Caroebe, Pacaraima e Rorainópolis foram os municípios que mais permaneceram nesse estrato durante o período. Para o nível de baixo risco de transmissão, Boa Vista foi o único município que permaneceu nessa condição ao longo do período. Outros municípios em um determinado ano também foram classificados com esse nível, entre eles Normandia e Bonfim, seguidos por São Luiz do Anauá. O município de Alto Alegre já esteve nessa categoria apenas em 2013 retornando à condição de risco moderado no ano seguinte e, nos anos sequenciais, atingiu o patamar de alto risco de transmissão (fig 20).

Figura 20 – Representação do índice parasitário anual estratificado por município por meio da Série histórica no intervalo 2009-2018



Analisada por outra perspectiva, a malária autóctone apresentou média anual de 7.953 ± 4.115 casos entre todos os municípios, sendo que seu maior número foi em 2010, com 14.694 casos. Na análise de cada município individualmente, observa-se que Cantá apresentou uma média anual de 1.357 ± 1.221 casos. Em 2010, esse município registrou sua maior ocorrência, com 3.885 casos de malária se mantendo no estrato de alto risco de transmissão. De 2012 a 2016 foi o período em que a malária se manteve mais baixa, reduzindo em 97% ($n = 102$) em 2016 em comparação a 2010, sendo a menor ocorrência para o período nesse município. Já em 2017, houve um pico ($n=1.582$) mantendo uma tendência ascendente até 2018 com aumento de 1,962% ($n = 2.103$) em relação a 2016.

Na direção oposta, o município de Boa Vista, ao longo do intervalo, sempre teve malária autóctone controlada, com média de 145 ± 111 casos considerado de baixa incidência quando comparado, por exemplo, com o município de Cantá. Em 2010, Boa Vista teve seu maior recorde, com 361 casos de malária contra 12 ocorrências em 2016, ano que representa a menor taxa do período. Nos anos seguintes, um aumento de casos foi observado (Fig 21).

No município de Pacaraima, fronteira com Venezuela, a malária autóctone durante o período apresentou uma média anual de 395 ± 413 , sua menor notificação ($n = 92$) ocorreu em 2011. No entanto, nos anos seguintes, a malária aumentou significativamente com um

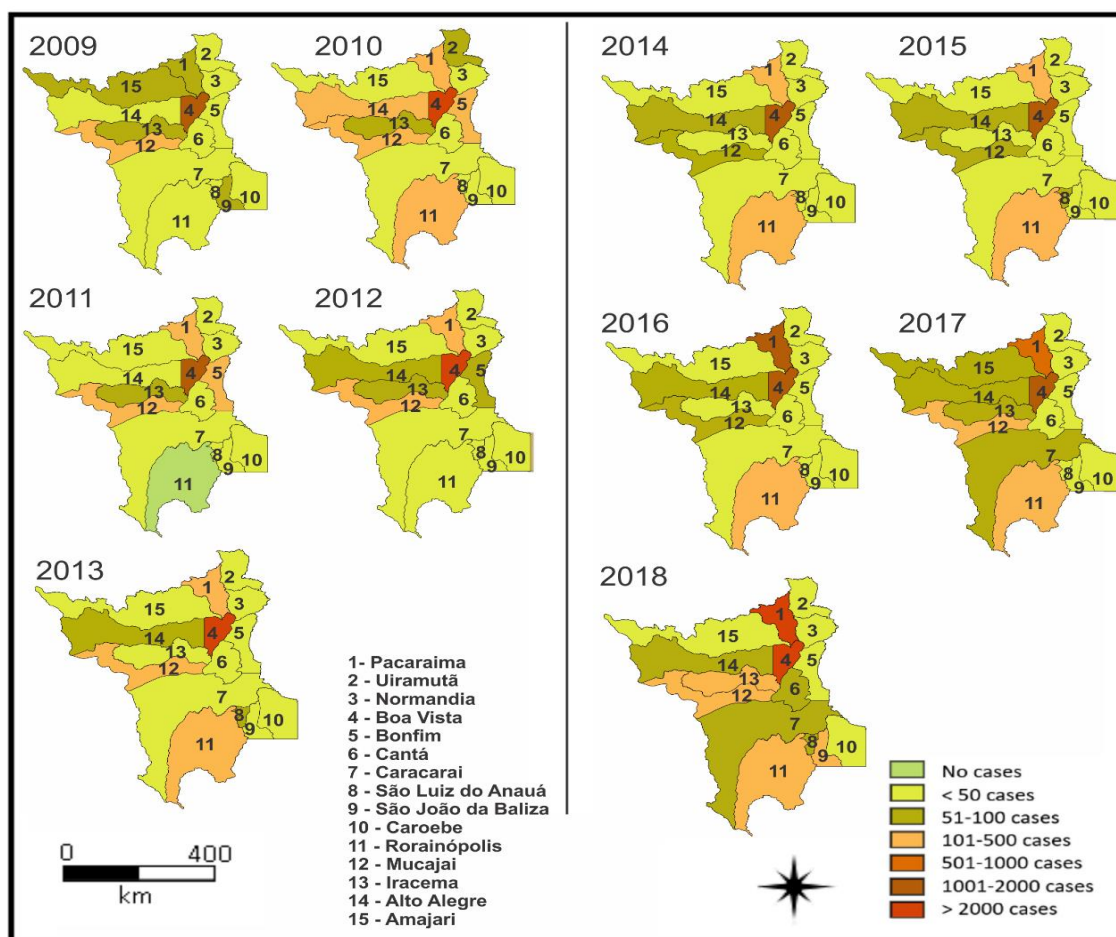
pico em 2018, aumentando 149% (n = 1.504) em comparação com 2011. Comparado com Pacaraima, o município de Bonfim, fronteira com Guiana, apresentou comportamento diferente no período, principalmente nos últimos anos. A média anual foi de 280 ± 298 casos, com maior incidência em 2011 (n = 821), mantendo tendência de queda nos anos seguintes, sendo que em 2017, apresentou a menor ocorrência de todo o período (n = 30).

6.8 Análise espacial dos casos da malária importada notificados nos municípios de Roraima

Os mapas abaixo descrevem a evolução da linha do tempo da malária importada estratificada por municípios de Roraima no intervalo 2009 a 2018. No geral, esse tipo de malária tem importância epidemiológica local devido ao volume de casos relatados em quatro dos quinze municípios nesse estado. Os municípios de Boa Vista, Mucajaí, Pacaraima e Rorainópolis, juntos, notificaram 31.308 correspondendo a 88,6% do total de de toda a malária importada no estado importados (n = 35.322). Entre esses municípios, Boa Vista foi a que mais relatou esse tipo de malária (n = 22.453), o que equivale a 63,6% do total da malária importada (fig. 21). Por outro lado, o município de Normandia registrou a menor taxa de malária nesse período (n = 95) equivalente a 0,3%. Em dez anos, o município registrou apenas 38 casos de malária adquiridos fora do território brasileiro.

Os dois municípios fronteiriços apresentaram comportamentos diferentes em relação a malária importada. Bonfim, que faz fronteira com a Guiana, teve uma baixa incidência, com 186 casos de malária, equivalente a 0,7% de toda a malária importada de outros países. Já a a malária adquirida na Guiana representou 92,5% (n = 172) do total dos importados. Em relação a Pacaraima, fronteira com a Venezuela, o município mantém uma forte relação com a malária importada daquele país e pouca influência sofre com a malária importada da Guiana ou de outros países. No período em questão, 5.982 casos de malária foram registrados no município, o equivalente a 21,5% do total de malária importada fora do território brasileiro, 98,6% (n = 5.898) foi adquirida na Venezuela.

Figura 21 – Espacialização da malária importada entre os municípios de Roraima



6.9 Estratificação da malária proveniente de outros municípios

A malária proveniente de outros municípios do estado de Roraima constitui um grande problema de saúde, pois, pode influenciar na manutenção da transmissão dentro de um município. No intervalo estudado a média anual foi de 719,3 (DP $\pm 1.031,29$), mostrando que há uma mobilidade de indivíduos com malária entre os municípios. Já a malária proveniente de outros estados da federação apresentou baixa ocorrência entre os municípios, uma vez que no período de dez anos foram registradas apenas 247 ocorrências.

Os resultados seguintes correspondem a um estudo retrospectivo e transversal realizado no período de 2016 a 2018, em BoaVista, Pacaraima e São João da Baliza/Rorainópolis. Tais resultados contempla o segundo objetivo desta pesquisa.

Na sequência apresenta-se dados prospectivos contemplando o segundo objetivo desse projeto realizado nos municípios de de Boa Vista, Pacaraima e São João da Baliza e Rorainópolis no período de 2016 a 2018.

6.10 Perfil sociodemográfico e epidemiológico da população de Boa Vista, Pacaraima e São João da Baliza e Rorainópolis noo período de 2016 a 2018

A tabela abaixo representa as características sociodemográficas dos participantes desse estudo, além disso, retrata o perfil epidemiológico dos indivíduos em busca de diagnóstico por meio de microscopia (exame de gota espessa) nos municípios de Boa Vista, Pacaraima e São João da Baliza e Rorainópolis (tabela 3).

Todas as variáveis que envolvem os aspectos sociodemográficos dos entrevistados, apresentaram significância estatística, exceto, a idade, que embora, tenha mostrado aproximação na média nos quatro cenários avaliados, contudo, sem diferença significativa entre os municípios ($p > 0,05$). Apenas no município de Pacaraima a maioria dos participantes do estudo foi de venezuelanos, diferentemente de Boa Vista, São João da Baliza e Rorainópolis que a maioria era de brasileiro.

Na entrevista foram catalogadas várias profissões, por exemplo, mecânico, padeiro, taxista entre outras. Porém, a ocupação autodeclarada exercida em região de garimpo divergia das profissões catalogadas. Desta forma, nesse estudo, considerou-se a ocupação exercida no momento da entrevista. Dentre as várias catalogadas, os indivíduos que exercem algum tipo de atividade em mineração tiveram alta prevalência nas notificações de Boa Vista. Outras ocupações, tais como agricultura, pecuária, pesca e atividades do lar foram mais presentes nos municípios de São João da Baliza, Rorainópolis e Pacaraima.

Em relação ao número de vezes que os indivíduos adquiriram malária anteriormente à data da coleta, Rorainópolis e São João da Baliza foram os municípios onde os indivíduos apresentaram menos episódios de malária em sua vida pregressa (>5). Em sentido contrário, Pacaraima apresentou maior frequência de episódios anteriores (<5). Já o tempo que se passou desde o último episódio (mensurado em dia), mostra que indivíduos notificados em Boa Vista, São João da Baliza e Rorainópolis apresentaram medianas menores do que 60 dias. Diferentemente de Pacaraima que apresentou mediana quase três vezes maior que os demais municípios (90 dias).

Quando perguntados sobre a sintomatologia, os 141 indivíduos de Rorainópolis e São João da Baliza foram os que menos relataram sintomas e os que menos tiveram resultados positivos detectados pelo exame de gota espessa. Porém, considerando soma geral dos municípios, os indivíduos sintomáticos foram expressivamente maiores. Pois, das 1.329 pessoas testadas, 88,6% (n=1.177) apresentaram algum tipo de sintoma. Além disso, na correlação entre tempo, sintomas e tratamento, os pacientes de Rorainópolis e São João da Baliza buscaram diagnóstico no primeiro dia de sintomas e nos demais municípios essa busca aconteceu quatro dias depois do indivíduo manifestar os primeiros sintomas.

Quando se compara a frequência das espécies por município, Rorainópolis e São João da Baliza tiveram mais *P. vivax* e rara detecção de *P. falciparum*. Situação oposta foi observada em Pacaraima que apresentou alta frequência de *P. falciparum*. Boa Vista embora tenha registrado bastante malária por *P. falciparum*, apresentou maior ocorrência de *P. vivax*.

A parasitemia dos indivíduos notificados em Rorainópolis e São João da Baliza é maior do que os demais municípios. Curiosamente, os pacientes desses dois municípios buscaram tratamento no mesmo dia do início dos sintomas.

Tabela 3 –Perfil sociodemográfico e epidemiológico da população estudada, por município em Roraima

Variáveis	Total (n)	Boa Vista n=520	Pacaraima n=648	Baliza/Rorainópolis n=161	P-valor
Gênero– n (%)					< 0.001*
Feminino		132 (25,4)	202 (31,2)	74 (46,0)	
Masculino		388 (74,6)	446 (68,8)	87 (54,0)	
Idade (ano). Mediana (IQR)		35 (28,44)	34 (25,44)	38 (24,49)	0.121**
Nacionalidade– n(%)					< 0.001*
Brasileiro		498 (95,8)	109 (16,8)	160 (99,4)	
Venezuelano		21 (4,0)	538 (83)	1 (0,6)	
Principal ocupação – n(%)					< 0.001*
Garimpeiro		336 (64,6)	267 (41,2)	0 (0)	
Outras ocupações		184 (35,4)	381 (58,8)	161 (100)	
Infecção prévia por malária – n (%)					< 0.001*
> 5		76 (14,6)	186 (28,7)	55 (34,2)	
≤5		396 (76,2)	409 (63,1)	85 (52,8)	
Nunca teve		48 (9,2)	53 (8,2)	21 (13,0)	
Última infecção*** (IQR)		40 (12,120)	90 (0,395)	32 (20,180)	< 0.001*
Sintomas – n (%)					< 0.001*
Sim		508 (97,7)	631 (97,4)	38 (23,6)	
Não		12 (2,3)	17 (2,6)	123 (76,4)	
Sintomas e tratamento**** (IQR)		5 (3,7)	4 (3,7)	0 (0,0)	< 0.001*
Espécie %					< 0.001*
Mista (F+V)		13 (4,3)	23 (3,9)	0 (0)	
<i>P. falciparum</i>		109 (36,5)	380 (64,2)	1 (5,6)	
<i>P. vivax</i>		177 (59,2)	189 (31,9)	17 (94,4)	
Parasitemia mediana (IQR)		530 (350,86)	468 (298,90)	1620 (853,29)	< 0.001**

Teste estatístico: * qui-quadrado χ^2); **Kruskal-Wallis ; *** refere ao tempo transcorrido desde o último episódio de malária mensurado em dias; **** mostra a mediana do intervalo de tempo em dias entre o início dos primeiros sintomas e o tratamento. Amplitude interquartis (IQR). O diagnóstico foi realizado por meio de microscopia (gota espessa).

6.11 Caracterização da população de estudo de acordo com o diagnóstico de malária

A Tabela 4 apresenta as características sociodemográfica e epidemiológica por município a partir do diagnóstico de malária realizado por duas técnicas gota espessa e

estudo molecular. Quando havia divergência no resultado nas duas técnicas considerou-se o resultado positivo como o diagnóstico definitivo. Os resultados de ambos os exames apresentaram divergências em todos os municípios como se segue: Em Boa Vista foram diagnosticados por meio de gota espessa 520 indivíduos dos quais 299 foram positivos (57,5%) resultado divergente do exame molecular que detectou 383 (73,7%) indivíduos positivos, revelando 84 pessoas com malária a mais do que o exame de gota espessa. Em Pacaraima de 648 indivíduos participantes do estudo, 592 (91,4%) foram positivos no exame de gota espessa e 605 (93,4%) indivíduos testaram positivo no exame molecular mostrando uma diferença de 13 casos de malária a mais que o exame de gota espessa. Em Rorainópolis e São João da Baliza, essa diferença ainda foi muito menor com apenas 4 casos positivos a mais detectados pelo exame molecular, sendo que dos 161 indivíduos testados, 18 (11,2%) foram positivos na gota espessa e 22 (13,7%) no exame molecular.

Observou-se na população total uma associação entre gênero e acometimento de malária ($p=0,012$). Entretanto, quando analisados os municípios individualmente, esta associação se dissipa, com predominância da população masculina em todos os municípios independentemente do diagnóstico. Entretanto, em São João da Baliza e Rorainópolis, essa diferença é muito pequena em relação aos demais municípios. Fato que pode ter relação com o tipo de ocupação ou profissão, haja vista que 52 mulheres (37,4%) exerciam atividades sem exposição ao vetor da malária dentre elas secretária e doméstica (atividade do lar). Situação oposta, foi observada em Boa Vista que registrou 388 indivíduos masculinos, desses 336 (86,6%) exerciam atividades em garimpo.

Em relação à faixa etária Boa Vista foi o único município que apresentou associação entre idade e acometimento de malária ($p = 0,001$), fato também observado no acumulado resultante da soma dos quatro municípios ($p < 0,001$).

O número de vezes que o indivíduo teve malária ao longo da vida, revela que pessoas com mais de cinco malária (> 5) foi maior em Boa Vista para esses indivíduos que testaram tanto positivo quanto negativo no momento da coleta. São João da Baliza e Rorainópolis foram os municípios com maior quantidade de pessoas que declararam que o número de episódios de malária foi igual ou menor de cinco (≤ 5) e o maior número de pessoas que afirmam nunca ter tido malária anterior à data da coleta. A associação dessas variáveis e o diagnóstico positivo e negativo só foi observada quando se aglutinaram todos os municípios considerando resultado total ($p = 0,007$).

Os pacientes que testaram positivos para malária majoritariamente apresentaram algum tipo de sintomas. Considerando a soma dos indivíduos de todos os municípios, os assintomáticos representaram 3,0 % (n=30). Rorainópolis e São João da Baliza foram os municípios que tiveram menos assintomáticos com resultados positivos. Apenas em Boa Vista não se observou associação estatística entre negativos e positivos ($p>0,05$).

A amostra é composta em sua maioria por brasileiros, embora na cidade fronteiriça de Pacaraima, os venezuelanos tiveram maior representatividade. Apenas no conjunto da amostra, existe uma diferença de proporção de pacientes testados positivo de acordo com a nacionalidade ($p<0,01$).

Os indivíduos que exerciam algum tipo de atividade em mineração foram expressivos em Boa Vista, quando comparados às outras ocupações. Ao contrário disso, em Rorainópolis e São João da Baliza não houve pessoas que tenham trabalhado em região de garimpo. Em Pacaraima, embora, muitos dos entrevistados se declararam garimpeiros, as demais ocupações tais como doméstica, estudante, vendedora entre outras foram superiores às atividades de mineração. Parte desses entrevistados venezuelanos adquiriram malária na zona rural da Venezuela no município de Santa Elena e outros municípios do estado de Bolívar, fronteira com Roraima. Contudo, associação entre positivo e negativo foi observada apenas em Pacaraima ($p< 0,005$) ou no conjunto das amostras ($p= 0,001$).

Tabela 4. Perfil sociodemográfico da população de acordo com o diagnóstico de malária de negativo e positivo por local de estudo

Variável	Boa Vista		Pacaraima		Baliza/Rorainópolis		Total		P-valor
	n=520	P-valor	n=648	P-valor	n=161	P-valor	n=1329	P-valor	
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	
Sexo – n (%)	0,792		0,123		0,374				0,012
Feminino	39 (28,5)	93 (24,3)	16 (37,2)	186 (30,7)	68 (48,9)	6 (27,3)	123 (38,6)	285 (28,2)	
Masculino	98 (71,5)	290 (75,7)	27 (62,8)	419 (69,3)	71 (51,1)	16 (72,7)	196 (61,4)	725 (71,8)	
Idade (anos), Mediana (IQR)	0,001		0,053		0,847				< 0,001
<26	22 (13,6)	83 (24,8)	13 (23,2)	177 (29,8)	39 (29,4)	9 (33,3)	74 (20,2)	269 (28,2)	
entre26e35	44 (32,1)	127 (33,6)	9 (21,4)	150 (24,9)	21 (15,4)	3 (11,1)	74 (25)	280(27,5)	
entre36 e43	30 (24)	93 (23,5)	6 (16,1)	136 (22,5)	36 (25,2)	6 (33,3)	72 (23,3)	235 (23)	
≥44	41 (30,3)	80 (18,1)	15 (39,3)	142 (22,8)	43 (30,1)	4 (22,2)	99 (31,4)	226 (21,3)	
Infecções prévias de malária – n (%)	0,158		0,409		0,316				0,007
> 5	109 (79,6)	287 (74,9)	28 (65,1)	381 (63,0)	46 (33,1)	9 (40,9)	183 (57,4)	677 (67,0)	
≤5	23 (16,8)	53 (13,8)	9 (20,9)	177 (29,3)	76 (54,7)	9 (40,9)	108 (33,9)	239 (23,7)	
Nunca teve	5 (3,6)	43 (11,2)	6 (14,0)	47 (7,8)	17 (12,2)	4 (18,2)	28 (8,8)	94 (9,3)	
Sintomas – n (%)	0,936		0,011		< 0,001				< 0,001
Não	6 (4,4)	13 (3,4)	3 (7,0)	14 (2,3)	116 (83,5)	7 (31,8)	131 (31,2)	27 (3)	
Sim	131 (95,6)	370 (96,6)	40 (93,0)	591 (97,7)	23 (16,5)	15 (68,2)	289 (68,8)	880 (97)	
Nacionalidade – n(%)	0,271		0,058		-				< 0,001
Brasileira	135 (98,5)	363 (95,0)	11 (26,2)	98 (16,2)	138 (99,3)	22 (100)	284 (89,3)	483 (47,9)	
Venezuelana	2 (1,5)	19 (5,0)	31 (73,8)	507 (83,8)	1 (0,7)	0 (0)	34 (10,7)	526 (52,1)	
Ocupação principal – n(%)	0,204		0,006		-				0,001
Garimpeiro	87 (63,5)	249 (65,0)	9 (20,9)	258 (42,6)	0 (0)	0 (0)	163 (38,8)	439 (48,4)	
Outras ocupações	50 (36,5)	134 (35,0)	34 (79,1)	347 (57,4)	139 (100,0)	22 (100,0)	257 (61,2)	468 (51,6)	

Teste estatístico: Kruskal-Wallis para mediana e Qui-quadrado para frequência

A tabela 5 mostra os casos positivos de malária autóctone e importada de países e notificada por município. Na somatória geral, a malária importada prevaleceu, concentrando-se em Boa Vista e Pacaraima. A maioria teve procedência da Venezuela seguido da Guiana. Os demais países (Guiana Francesa e Suriname) tiveram baixa ocorrência entres os municípios. Já malária autóctone foi prevalente no município de Rorainópolis e São João da Baliza.

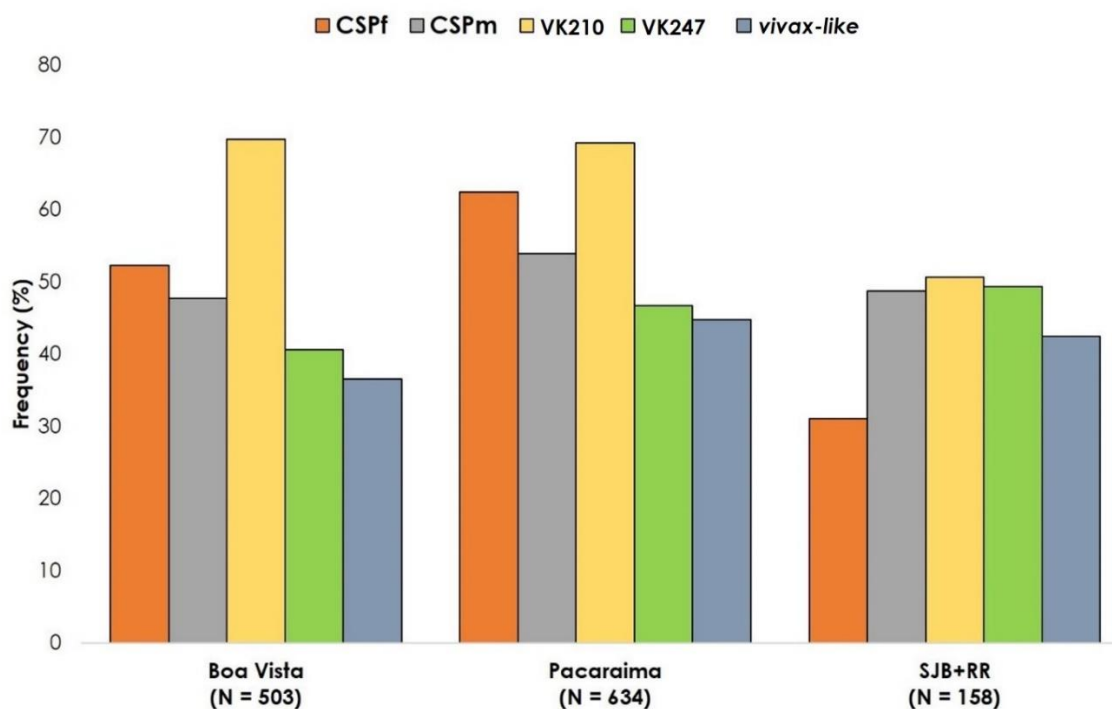
Tabela 5- Número de casos de malária por local de infecção estatificado por país

Municípios	Boa Vista	Pacaraima	Rorainópolis/Baliza	Total
	383	605	22	1010
Local de infecção %				
Autóctone	40 (10,4)	8 (1,3)	18 (81,8)	66 (6,5)
Importado	343 (89,6)	597 (98,7)	4 (18,2)	944 (93,5)
País de infecção %				
Brasil	40 (10,4)	8 (1,3)	18 (81,8)	66 (6,5)
Venezuela	218 (56,9)	584 (96,5)	2 (9,1)	804 (79,6)
Guiana	117 (30,5)	5 (0,8)	1(4,5)	123 (12,2)
Outros países	8 (2,1)	8 (1,3)	1(4,5)	17 (1,7)

6.12 Prevalência de anticorpos para a proteínas circunsporozoíta (CSP)

A prevalência de anticorpos para a proteína CS na população estudada foi de 67.2% para VK210, 44.6% e 41.3% para VK247 e *P. vivax-like* respectivamente. Já a prevalência de anticorpos para o *P. falciparum* foi de 54.7% e para o *P. malariae* foi de 50.9%. Quando avaliamos as prevalências de anticorpos por localidade observamos que em todas elas foram detectados anticorpos para todas as proteínas testadas. Entretanto a prevalência de anticorpos para VK210 predominou em todas as áreas estudadas, não havendo diferença para as variantes VK247 e *P. vivax-like*. Já os anticorpos para a proteína CS de *P. falciparum* e *P. malariae* tiveram maior frequência em Pacaraima. Em São João da Baliza/Rorainópolis, a prevalência de anticorpos para a CS de *P. falciparum* foi menor. (fig. 22)

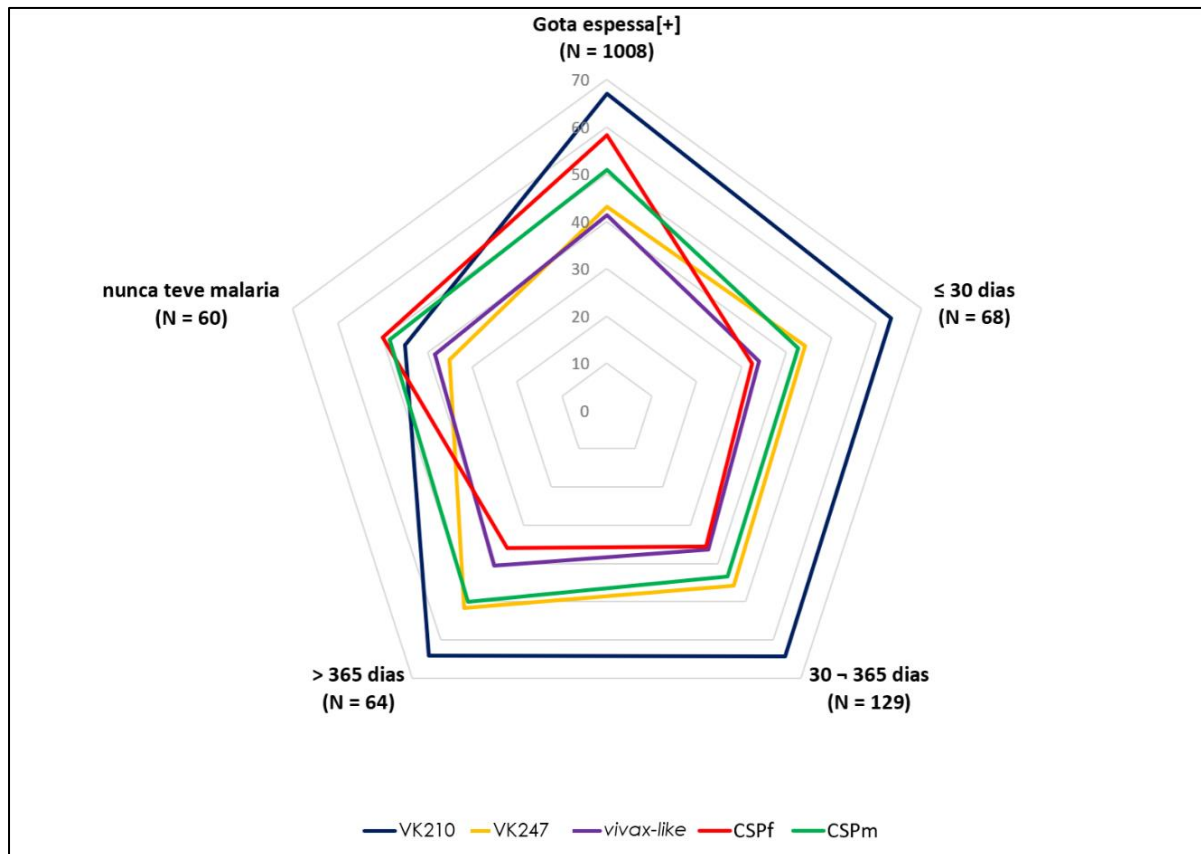
Figura 22 - Prevalência de anticorpos para a proteína CS distribuída por município



Proteína CS: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* (VK210) e variantes (VK247 e *P. vivax-like*) detectadas nos municípios de Boa Vista, Pacaraima e São João da Baliza (SJB)/Rorainópolis (RR);

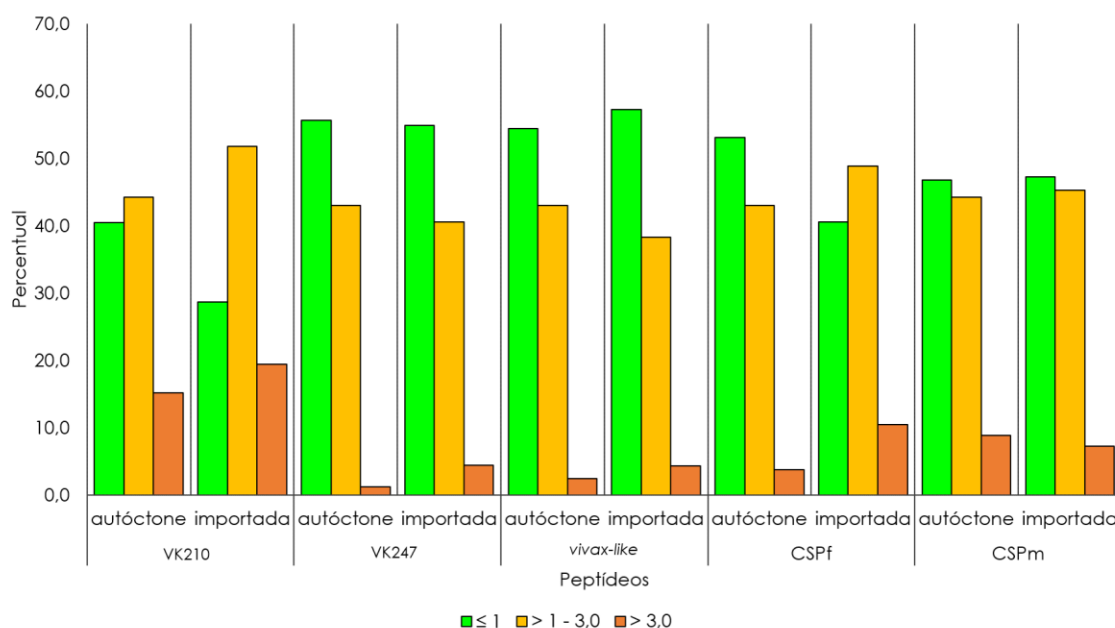
Com o objetivo de avaliarmos se os anticorpos para proteína CS poderiam indicar malária atual ou recente, nós comparamos a frequência de anticorpos nos indivíduos de acordo com o tempo desde a última infecção. Os indivíduos foram separados nos seguintes grupos: indivíduos com gota espessa positiva, com gota espessa negativa, mas com diferentes intervalos de tempo desde a última infecção (≤ 30 dias, >30 e <365 dias; >365 dias) e indivíduos que nunca tiveram malária. Os resultados mostram que não houve diferença significativa na frequência de anticorpos para a proteína CS entre os indivíduos com gota espessa positiva e gota espessa negativa independente do tempo desde a última infecção, inclusive quando comparados com os indivíduos que nunca tiveram malária.

Figura 23 - Respostas de anticorpos ao tempo desde a última infecção



O gráfico da figura 24 foi dividido em intervalos para mostrar índice de reatividade (IR) dos anticorpos para proteína CS, que neste caso foi estratificada por local de infecção (autóctone e importada de outros países). O (IR) é considerado negativo quando for ≤ 1 e positivo em (>1). No geral a resposta da proteína CS ficou muito próxima nos dois cenários, contudo, analisando individualmente cada variação e sua intensidade de resposta, observou que: o $IR \leq 1$ nos casos autoctones foi prevalente exceto na variação (*P. vivax-like*) que foi discretamente maior nos importados. O intervalo do IR entre >1 a 3,0 apresentou maior ocorrência nas resptiçoes VK247 e *P. vivax-like* dos autoctones. Os demais intervalos apresentaram baixa ocorrência em ambos os cenários.

Figura 24- Frequência do Índice de reatividade da Proteína CS por local de infecção



A tabela 6 e 7 exibe a correlação entre a resposta dos anticorpos para CS de acordo com a idade e o gênero, categorizadas por meio de seus quartis. Para a idade, com a exceção de *P. vivax-like* ($p=0,207$), o IR para CS são significativamente maiores nas faixas etárias mais avançadas. Em relação ao sexo, as respostas dos anticorpos a todos os peptídeos obtiveram valores medianos estatisticamente distintos entre os sexos. Em todos os casos de peptídeos, o sexo masculino apresentou valores medianos mais elevados.

Tabela 6 - Índice de reatividade (IR) dos anticorpos para as proteínas CS nas diferentes faixas etárias

Peptídeos	Faixa etária				P-Valor
	<26 anos n = 343	26 – 35 anos n = 354	35 – 44 anos n = 307	> 44 anos n = 325	
VK210 mediana (IQR)	1,3 (0,9;2)	1,5 (0,9;2,3)	1,4 (0,9;2,4)	1,7 (1,1;3,3)	< 0,001
VK247 mediana (IQR)	1 (0,7;1,7)	1 (0,7;1,5)	0,9 (0,6;1,4)	1 (0,7;1,5)	0,008
<i>P. vivax-like</i> mediana (IQR)	0,9 (0,7;1,4)	1 (0,6;1,5)	0,9 (0,6;1,3)	1 (0,7;1,6)	0,207
CSPf mediana (IQR)	1,2 (0,7;1,8)	1,2 (0,8;1,8)	1,1 (0,7;1,7)	1,3 (0,8;2,2)	0,027
CSPm mediana (IQR)	1 (0,7;1,7)	1 (0,8;1,6)	1 (0,7;1,6)	1,2 (0,8;1,9)	0,048

Foi utilizado Teste Kruskal-Wallis para comparar múltiplas variáveis não paramétricas: Proteína CS: *P. falciparum* (CSPf), *P. malariae* (CSPm), *P. vivax* (VK210) e variantes (VK247 e *P. vivax-like*)

Tabela 7 - Resposta dos anticorpos para as proteínas CS associada ao sexo

Peptídeos	Sexo		P-Valor
	Feminino n = 408	Masculino n = 921	
VK210 mediana (IQR)*	1,2 (0,9;2,2)	1,6 (1;2,7)	< 0,001
VK247 mediana (IQR)	0,9 (0,6;1,4)	1 (0,7;1,5)	0,036
<i>P.vivax-like</i> mediana (IQR)	0,9 (0,6;1,3)	1 (0,7;1,5)	0,042
CSPf mediana (IQR)	1 (0,7;1,8)	1,2 (0,8;1,9)	0,014
CSPm mediana (IQR)	1 (0,7;1,5)	1,2 (0,8;1,8)	0,007

Teste Ranksum; *Intervalo interquartil

Os resultados seguintes representam o ultimo objetivo especifico dessa tese que resultou na publicação de um artigo intitulado “*The impact of imported malaria by gold miners in Roraima: characterizing the spatial dynamics of autochthonous and imported malaria in an urban region of Boa Vista*” - *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 115: e 200043, 2020; doi: 10.1590/0074-02760200043. “ Jaime Louzada, Nathália Coelho Vargas de Almeida, Joao Luiz Pereira de Araujo, Júlio Silva, Thiago M Carvalho, Ananias A. Escalante and Joseli Oliveira-Ferreira. (anexo 4)

Para os dados do município de Boa Vista analisados neste artigo, considerou-se apenas o resultado de exame de gota espessa, pois, as amostras submetidas ao exame molecular não foram processadas a tempo em razão do volume de amostras dos quatro municípios.

6.13 Características da população do município de Boa Vista

Participaram do estudo 520 indivíduos, sendo 299 (57,5%) positivos para malária, detectados por meio de exame de gota espessa. Conforme observado na Tabela 8, a maioria dos indivíduos é do sexo masculino (74,6%), apresentando média de idade de 36 anos de nacionalidade predominantemente brasileira com residência permanente em Boa Vista, Estado de Roraima. Esses indivíduos tinham como ocupação principal, atividades em mineração, sobretudo, nos garimpos localizados na Venezuela e na Guiana. No geral, 468 indivíduos apresentaram história de episódios de malária (90%), sendo que a maioria relatou mais de cinco episódios (74,4%) e 10% não se lembravam de infecção anterior em sua vida pregressa. Dos indivíduos assintomáticos (n=19), 68,4% tiveram diagnóstico positivo para malária, enquanto 31,6% foram negativos. Não foi observada diferença

estatística na nacionalidade, local de residência, ocupação e número de episódios de malária nos últimos três anos entre indivíduos positivos e negativos. No entanto, a proporção de indivíduos positivos para malária diminuía conforme aumentava a idade, como se observa na faixa etária entre 36-44 anos (OR = 0,59, IC 95% 0,350,98; p = 0,04) e > 44 (OR = 0,36, IC 95% 0,21 - 0,6; p <0,01) , em comparação com grupos de idades mais jovens.

Tabela 8 - Características da população de estudo segundo diagnóstico de malária em Boa Vista, Estado de Roraima no período de 2016 a 2018

Variáveis	Diagnóstico de malária			Razão de probabilidade (IC 95%)	p-valor
	Positivo 299	Negativo 221	Total 520		
Gênero n (%)					
Masculino	225 (75,2)	163 (73,7)	388 (74,6)	1,08 (0,73-1,61)	0,7
Feminino	74 (24,8)	58 (26,3)	132 (25,4)	1	-
Faixa etária n (%)					
< 28	92 (30,8)	41 (18,5)	133 (25,6)	1	-
28 – 35	83 (27,7)	60 (27,1)	143 (27,5)	0,62 (0,38 – 1,01)	0,06
36 – 44	70 (23,4)	53 (24,0)	123 (23,6)	0,59 (0,35 – 0,98)	0,04
> 44	54 (18,1)	67 (30,4)	121 (23,3)	0,36 (0,21 – 0,6)	< 0,01
Nacionalidade n (%)					
Brasileiro	284 (94,3)	215 (97,3)	497 (95,6)	1	-
Venezuelano	15 (5,0)	6 (2,7)	21 (4,0)	1,9 (0,72 – 4,98)	0,19
Guianense	2 (0,7)	0 (0,0)	2 (0,4)	-	-
Ocupação n (%)					
Garimpeiro	186 (62,2)	150 (67,9)	336 (64,6)	1	-
Outra ocupação	113 (37,8)	71 (32,1)	184 (35,4)	1,28 (0,89 – 1,85)	0,18
Local de residência n (%)					
Boa Vista	293 (98,0)	218 (98,7)	511 (98,2)	-	-
Outro município / estado	6 (2,0)	3 (1,3)	9 (1,8)	1,49 (0,37 – 6,02)	0,58
Episódios anteriores de malária n (%)					
< 5	222 (74,2)	165 (74,7)	387 (74,4)	1	-
≥ 5	40 (13,4)	41 (18,6)	81 (15,6)	0,8 (0,5 – 1,29)	0,37
Nunca teve	37 (12,4)	15 (6,7)	52 (10,0)	1,72 (0,87 – 3,39)	0,12
EM nos últimos 3 anos mediana (IQR)	0 (0,1)	1 (0,1)	1 (0,1)	1,1 (0,88 – 1,38)	0,41
Dias desde a última infecção *	60 (30.180)	60 (30.180)	60 (30.180)	1 (1.1)	0,76
Sintomas n (%)					
Sim	286 (95,6)	215 (97,2)	501 (96,3)	1,36 (0,43 – 4,28)	0,6
Não	13 (4,4)	6 (2,8)	19 (3,7)	1	-

*mediana (IQR); a razão de probabilidade foi usada para quantificar a força da associação entre variáveis. P-valor < 0,05 foram significativos. IQR: intervalo interquartil

6.14 Características dos criadouros da cidade de Boa Vista

Boa Vista está localizada em área com grandes rios, riachos e lagos, características que favorecem a existência de criadouros, além do clima favorável à presença dos

principais vetores da malária. Os locais de reprodução foram lagos naturais, riachos e rios permanentes. Essas coleções de água são parcialmente sombreadas e ensolaradas com a presença de vegetação marginal, principalmente, nas partes onde existe água parada e escura, características comuns entre os 23 criadouros identificados, pela equipe de entomologia da Secretaria Estadual de Saúde de Roraima. Esses criadouros eram *habitat* para larvas de *Anopheles spp.* As espécies *An. darlingi* e *An. albitarsis* foram encontradas em todos os criadouros investigados, no entanto, em alguns criadouros outras espécies também foram encontradas, *An. nuneztovari s.l.*, *An. mattogrossensis*, *An. triannulatus* e *An. evansae*.

6.15 Distribuição da malária em Boa Vista por local de infecção

Dentre os indivíduos que participaram desse estudo, 299 testaram positivo para malária, dos quais 294 (98,3%) foram importados e apenas 5 (1,7%) autóctones da zona urbana de Boa Vista. Entre esses, 172 estavam infectados com *P. vivax*, 109 com *P. falciparum*, e 13 com infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*). Entre os casos autóctones, o *P. vivax* foi a espécie mais prevalente (100%), já os casos importados corresponderam a 57,5%. Portanto, os casos de malária por *P. falciparum* e mistas (*P. falciparum* + *P. vivax*) detectados nesse estudo foram importados (Tabela 9).

Entre os positivos, a maioria tem nacionalidade brasileira (94,6%) seguida por venezuelana (5,1%) e guianense (0,3%). Entretanto, um grande número de casos importados foi adquirido na Venezuela (58,8%) e Guiana (32,3%). Os casos de Guiana Francesa e Suriname corresponderam apenas a 1%. Além desses, 7,7% dos casos notificados em Boa Vista vieram de outros municípios de Roraima ou outros estados no Brasil. Os indivíduos com *P. falciparum* tiveram, em média, uma parasitemia maior do que os indivíduos infectados com *P. vivax* e infecções mistas. Em média, pacientes infectados com *P. falciparum* e / ou infecções mistas procuravam diagnóstico e tratamento cerca de cinco dias após o início dos sintomas (Tabela 9).

Tabela 9- Características da infecção por malária importada e autóctone diagnosticada em Boa Vista, Estado de Roraima durante 2016 a 2018

Variável	Autóctone	Importada	Total
Infecção de malária n (%)	5 (1,7)	294 (98,3)	299 (57,5)
Faixa etária n (%)			
< 28	3 (60,0)	89 (30,3)	92 (30,8)
> 44	0 (0)	54 (18,4)	54 (18,1)
28 – 35	1 (20,0)	82 (27,9)	83 (27,8)

36 – 44	1 (20,0)	69 (23,5)	70 (23,4)
Gênero, masculino n (%)	4 (80,0)	221 (75,2)	225 (75,3)
Espécie plasmodial n (%)			
<i>P. falciparum</i>	0 (0)	109 (37,1)	109 (36,5)
<i>P. vivax</i>	5 (100)	172 (58,5)	177 (59,2)
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	0 (0)	13 (4,4)	13 (4,3)
Nacionalidade n (%)			
Brasileiro	5 (100)	278 (94,6)	283 (94,6)
Guianense	0 (0)	1 (0,3)	1 (0,3)
Venezuelano	0 (0)	15 (5,1)	15 (5,0)
Local de infecção n (%)			
Boa Vista	5 (100)	0 (0)	5 (1,7)
Guiana	0 (0)	95 (32,3)	95 (31,8)
Outros países	0 (0)	3 (1,0)	3 (1,0)
Outros municípios / estados	0 (0)	23 (7,8)	23 (7,7)
Venezuela	0 (0)	173 (58,8)	173 (57,9)
Parasitemia mediana (IQR)			
<i>P. falciparum</i>	-	503 (280,900)	503 (280,900)
<i>P. vivax</i>	800 (463,1200)	462 (287,2,900.8)	468 (298,903)
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	-	534 (410,761)	534 (410,761)
Dias desde os primeiros sintomas mediana (IQR)	6 (6,13)	4 (3,6)	4 (3,6)

Dias desde os primeiros sintomas: intervalo de tempo entre os primeiros sintomas e diagnóstico e tratamento.
IQR: intervalo interquartil

6.16 Distribuição espacial das espécies infectantes de malária

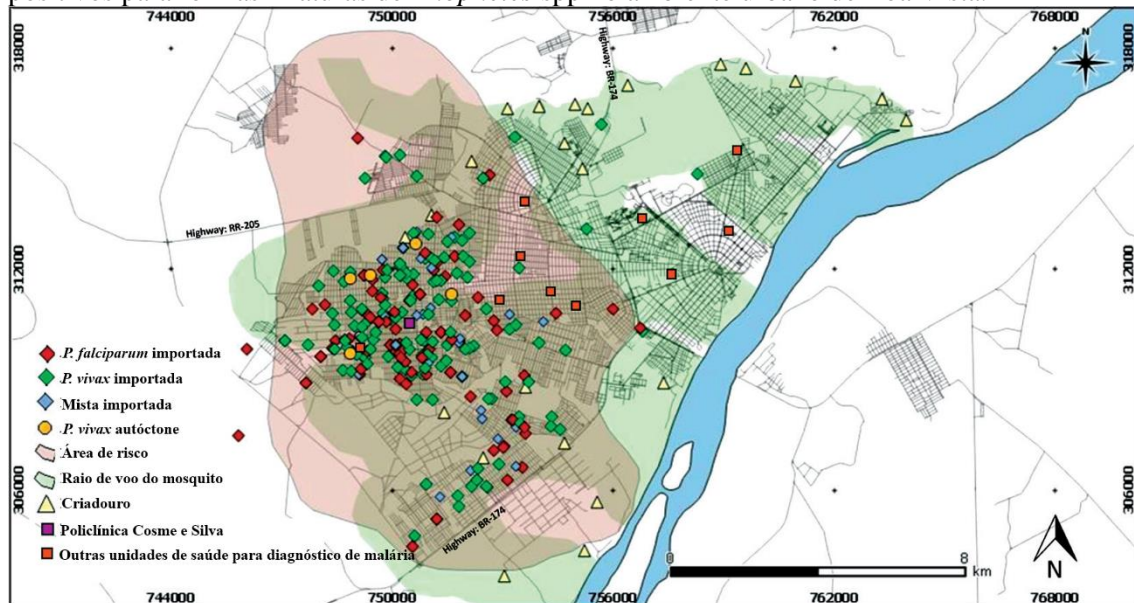
Os endereços disponíveis de 271 indivíduos com malária importada e cinco casos autóctones foram usados para traçar o espaço e a distribuição da malária por espécie, contudo nem todos os 299 positivos vivem na cidade de Boa Vista e por essa razão foi excluídos 23 indivíduos. Dos cinco indivíduos com malária por *P. vivax*, apenas dois afirmaram ter adquirido malária no local onde mora, os outros três, relataram que o local da infecção foi no bairro onde trabalhavam. Todos os indivíduos afirmaram não ter saído do município de Boa Vista no último mês.

Um raio de 1 km foi estabelecido a partir dos criadouros identificados como área de cobertura de vôo do mosquito região verde do mapa (Fig. 25) e uma área com risco de transmissão da malária foi delimitada considerando a localização dos casos autóctones e importados e suas relações espaciais com os criadouros região rosa do mapa (Fig. 25).

A maioria dos pontos plotados é de malária por *P. vivax* (151 importados e 5 autóctones), a malária por *P. falciparum* corresponde a 88 pontos georreferenciados, enquanto os 32 pontos no mapa representam malária mista. O mapa inclui ainda, 23 criadouros georreferenciados na cidade Boa Vista. Observamos que a maioria dos casos se

concentrava na parte oeste da cidade. Além dessa região, diversos criadouros também foram identificados na zona leste da cidade (área verde na Fig. 25).

Figura 25 - Distribuição dos casos de malária por espécie de plasmódio, origem e criadouros positivos para formas imaturas de *Anopheles* spp no ambiente urbano de Boa Vista.

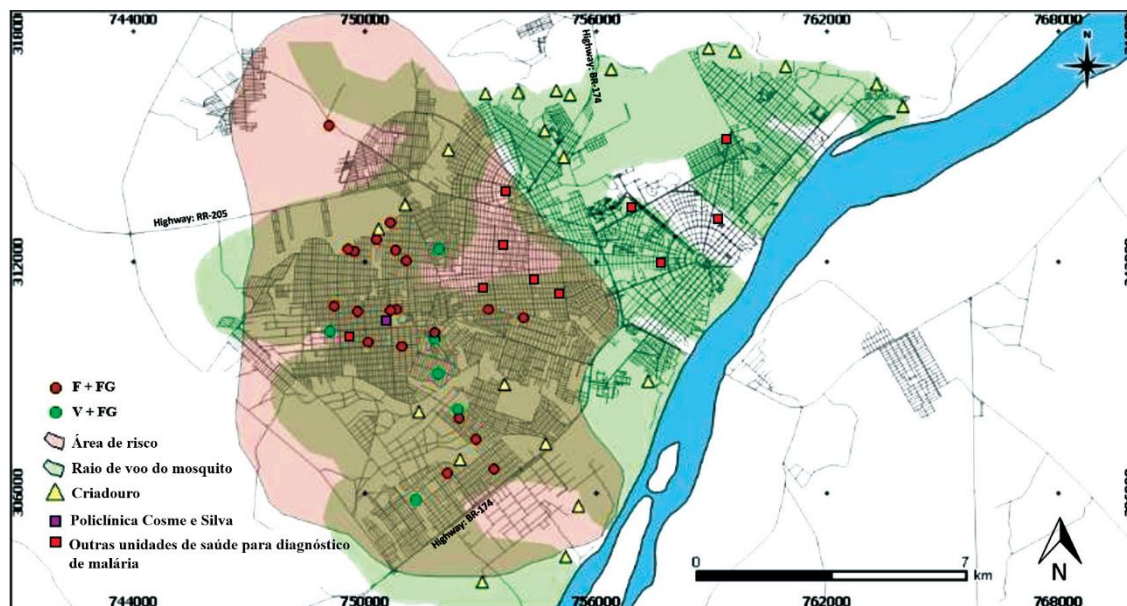


Fonte: o autor

6.17 Distribuição espacial de portadores de gametócitos

A residência de indivíduos diagnosticados com gametócitos de *P. falciparum* e *P. vivax* e sua relação com os criadouros foi também mapeada conforme pode ser observado na figura 26. Indivíduos com gametócitos foram encontrados dentro do raio de vôo dos *Anopheles* estabelecidos a 1 km (área verde) da coleta de larvas nos pontos dos riachos e rios positivos tanto para *An. darlingi* quanto para *An. albitarsis*. A maior concentração desses indivíduos estava na zona sul e oeste do município. Esta última possui o maior número de bairros, 33, e é o mais populoso com 152.062 habitantes. A maioria desses bairros está nos arredores da cidade, dentro da faixa de criadouros (cor rosa no mapa da Fig. 26). É importante referir que 73% dos portadores de gametócitos só procuraram o diagnóstico e tratamento 48 horas após o início dos sintomas. Portanto, esses indivíduos estavam vivendo em áreas de risco de transmissão da malária (cor rosa no mapa da Fig. 26) em diversos bairros de Boa Vista, inclusive a maioria residia na zona mais populosa do município.

Figura 26 - Distribuição espacial de indivíduos portadores de gametócitos e vetores no ambiente urbano de Boa Vista.



Fonte: o autor; F + FG: indivíduos com esfregaço de sangue espesso positivo para estágios de *Plasmodium falciparum*, incluindo gametócitos de *P. falciparum*; V + FG: indivíduos com esfregaço de sangue espesso positivo para estágios de *P. vivax* incluindo gametócitos de *P. vivax*.

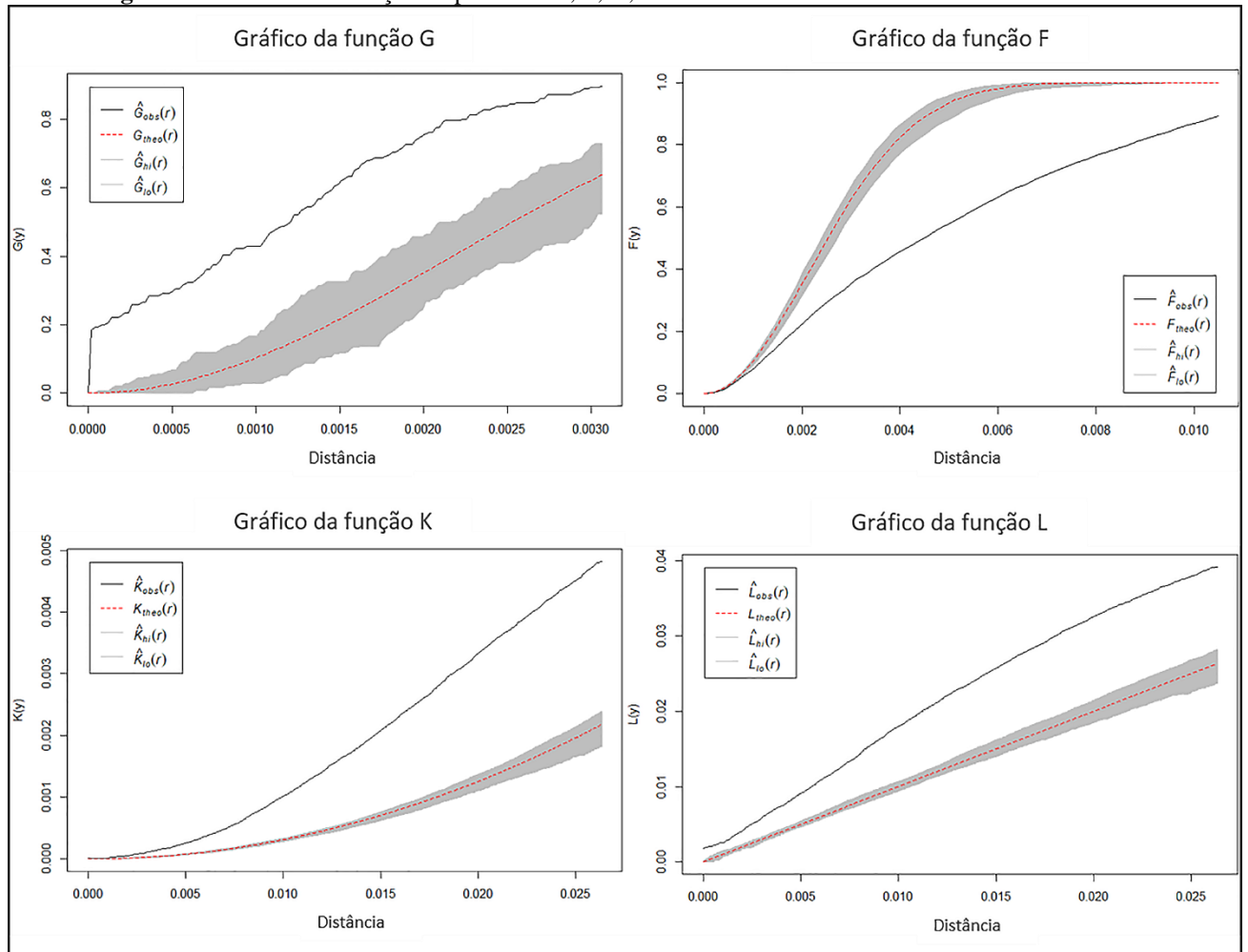
6.18 Risco de transmissão local da malária na zona oeste da cidade de Boa Vista

De acordo com os resultados do teste [Kolmogorov-Smirnov = 0,2376 ($p < 0,001$ em IC de 95%)], existem locais específicos que tendem uma maior frequência de casos de malária. Isso mostra a circulação de indivíduos com malária ao longo da zona oeste do município de Boa Vista, refletindo no aumento do risco de transmissão da malária.

Os resultados da figura 27 (função G) mostram que os valores observados, ou seja, a distância entre os casos de malária e indivíduos portadores de gametócitos perto dos criadouros (linha preta), estão fora e acima do intervalo de confiança dado pela área cinza. Portanto, a circulação de indivíduos com a doença próximo aos criadouros é um fator de risco para a transmissão local da malária. Em uma área mais ampla, figura 27 (função F), os valores observados, ou seja, a taxa de risco (linha preta), estão fora e abaixo do intervalo de confiança fornecido pela área cinza. Assim, pelo comportamento do gráfico de funções, a presença de indivíduos com malária nesta parte do município apresenta risco de transmissão local da doença. De fato, na figura 27 as medidas reduzidas de segunda ordem (funções K e L) endossam o risco de transmissão local da malária, indicadas nas funções G e K. Portanto, a distribuição espacial e a proximidade dos casos de malária, indivíduos

portadores de gametócitos e criadouros de vetores da malária favorece a transmissão local da doença.

Figura 27 - Análise das funções específicas G, F, K, L.



7. DISCUSSÃO

O Brasil possui extensa região de fronteira com 2.357.850 km de extensão equivalendo a 27,6% do território nacional onde residem 9.855.132 habitantes, representando 6% da população brasileira distribuída entre 588 municípios, sendo três capitais: Boa Vista-RR, Rio Branco-AC e Porto Velho-RO (146).

Compondo esta região fronteiriça, o estado de Roraima apresenta 1.537 quilômetros de fronteira seca compartilhada com a Venezuela e a Guiana. Sua faixa de fronteira é composta por seis municípios (Boa Vista, Cantá, Mucajaí Rorainópolis, São João da Baliza, São Luiz). Já na sua linha de fronteira encontram-se nove municípios (Alto Alegre, Amajari, Caracarái, Caroebe, Iracema, Normandia, Uiramutã), incluindo as duas cidades gêmeas de Pacaraima (BR) com Santa Elena do Uairén (VE); Bonfim (BR) e Lathen (GUI) (146, 147).

Juntas, essas cidades promovem intensa mobilidade em razão do comércio local, do garimpo e, recentemente, do movimento migratório venezuelano que trouxe impacto na demanda do serviço de saúde para os municípios de Pacaraima e Boa Vista. Desta forma, a movimentação de pessoas nas cidades gêmeas, assim como o fluxo dos indivíduos na faixa fronteiriça que engloba vários municípios do estado, vem revelando as fragilidades nos mecanismos de controle sanitário das doenças dessa região. A eficácia desses mecanismos nas regiões de fronteira no mundo vem sendo questionada desde o advento da AIDS na década de 1980, pandemia que acendeu o alerta, apontando, “*que não existem fronteiras para as doenças transmissíveis*” (114). Nesse sentido, entender a dinâmica espacial na linha e na faixa de fronteira, local de passagem ou de permanência que gera proximidades, distanciamentos e conflitos entre os vários atores que compõe o universo fronteiriço pode ser fundamental para o controle sanitário e para as intervenções no âmbito das doenças transmissíveis (115).

Entender os modelos de interação (margem, zona-tampão, frente, capilar, sinapse) nas fronteiras de Roraima é importante para viabilizar os mecanismos de controle e intervenção da malária já que esta doença está associada à circulação de pessoas na linha de fronteira. Por exemplo, em Pacaraima a malária importada está associada à crise econômica na Venezuela que vem influenciando no aumento da procura por diagnóstico e tratamento da malária; além disso, o comércio dos produtos procedentes dos garimpos ilegais se estende por diversos municípios localizados na zona de fronteira. Dentre os vários

municípios que compõem esta zona, a cidade de Boa Vista se configura como um grande polo comercial desses produtos, além de representar a maior referência para o diagnóstico e tratamento da malária dentre todos os municípios. A capilarização do movimento de pessoas com malária dentro do estado, pode constituir um problema, considerando o potencial de receptividade dos municípios somado à complexidade logística em torno da operacionalização das ações de controle da malária.

O estado de Roraima apresenta uma extensa faixa de fronteira com a Venezuela e Guiana além de contatos estreitos com o Suriname e Guiana Francesa, fato que estabelece intensa mobilidade de pessoas e mercadorias na região. Além da malária produzida no seu espaço, Roraima ainda notifica uma grande quantidade de malária procedente desses países, caracterizando esse espaço como região malárica de alta complexidade e de difícil controle dada a dinâmica desse lugar. O fluxo de pessoas entre as “cidades irmãs” promove, nessa região, intensa mobilidade em torno do comércio em geral, do garimpo e, recentemente, do movimento migratório, dinâmica que caracteriza a malária nesse estado como um problema de saúde de fronteira.

A produção e disseminação das doenças transmissíveis nas regiões de fronteira no mundo geram políticas e ações cruciais em diversos programas de saúde de vários países que têm áreas de fronteira (114). No Brasil, sobretudo na região Amazônica, a malária vem apresentando importante redução, porém, nas zonas fronteiriças ainda é altamente vulnerável constituindo um desafio para sua eliminação (148). Assim, esse desafio passa por diversos fatores dentre os quais: carência de profissionais de saúde qualificados, dificuldade de acesso aos serviços de saúde especializados, movimento migratório, mobilidade da população indígena, presença de madeireiros em torno do desmatamento, movimentação de garimpeiros (115, 149,150). Dessa forma, a intensa mobilidade humana somada à baixa efetividade do controle sanitário resulta na manutenção da transmissão nos municípios localizados no entorno da divisa, a exemplo de Pacaraima em Roraima que apresentou pico de malária em 2018 e Oiapoque no Amapá que registou vários surtos entre 2003 a 2007 (148). Enquanto no Oiapoque, a malária importada foi trazida por brasileiros procedentes de minas ilegais da Guiana Francesa, em Pacaraima a malária importada é procedente de várias regiões da Venezuela tanto de área rural quanto de garimpo ilegal, em sua maioria trazida por Venezuelanos (148).

A complexidade da região de fronteira com suas múltiplas características pode se tornar um importante obstáculo para o controle e eliminação da malária no mundo. Estudo sobre o sistema de monitoramento na fronteira entre Brasil e Guiana Francesa por meio de

indicadores epidemiológicos identificou mudanças nas “séries temporais” relacionadas às atividades de controle em diferentes espaços, o que mostra importância do monitoramento constante na região de fronteira dada a sua multiplicidade de fatores no processo de transmissão da malária: fatores ecológico-ambientais, biológicos e sociais foram identificados num estudo na fronteira franco-brasileira revelando que populações que vivem e circulam nesse espaço em vulnerabilidade social favorecem a ocorrência de surtos e perpetuação da malária (151-153). A associação da malária com o risco social também pode ser observada em Pacaraima que vem registrando aumento extraordinário dessa doença em razão do movimento migratório venezuelano (151,154). Porém, uma realidade distinta é registrada em Bonfim, fronteira com a Guiana que tem apresentado baixa ocorrência de malária importada, mesmo considerando um grande fluxo de indivíduos com malária que passa por esse município vindo da Guiana (151).

A tríplice fronteira entre Brasil, Guiana e Venezuela é uma região malárica extensa que apresenta determinantes de grande importância para processo de transmissão da malária tanto na linha quanto na zona de fronteira, a saber:

Um ambiente adequado para desenvolvimento dos principais vetores favorece a permanência da malária autóctone em todos os municípios de Roraima, isso mostra a necessidade da existência de um sistema de vigilância eficiente;

A falta de um sistema de monitoramento epidemiológico específico para a linha de fronteira facilita a entrada de indivíduos com malária importada, sobretudo, com *P. falciparum* (153, 154). Essa é uma razão de preocupação de outros países de fronteira que desenvolvem estudos que demonstram tal preocupação e por isso, implementam estratégias para redução da transmissão da malária no seu espaço de fronteira, a exemplo da Guiana Francesa, China, Tailândia e África do Sul que priorizam o controle da fronteira como ferramenta para redução da malária (153-159).

A distribuição de casos autóctones em diversos cenários como área urbana, zona rural e área indígena, são características que representam grande obstáculo para o controle da malária nessa região, assim como a complexidade da logística que dificulta o manejo das ações de entomologia, principalmente em área indígena (154);

A inexistência de cooperação bilateral entre esses três países dificulta as ações de controle da malária nessa região, fato que pode ser agravado em razão da crise diplomática entre Brasil Venezuela. Nesse sentido, experiências exitosas de outros países poderiam servir de modelo para o Brasil, a exemplo da China que reforça a importância da cooperação bilateral entre os países fronteiriços como estratégia de eliminação. No mesmo

sentido países andinos (Venezuela, Peru, Colômbia e Equador) estabeleceram cooperação para contenção de malária, fato que não ocorreu entre Brasil e Venezuela, gerando tensões e conseqüentemente a manutenção do quadro atual da malária no estado (157-159);

Por fim, as questões sociais que impulsionam o movimento dos indivíduos em busca de sobrevivência, principalmente em atividades de mineração ilegal que desde 2017 com a crise econômica no Brasil uma crescente circulação de garimpeiro vem apontando impacto crescente na malária em Roraima tanto importada quanto autóctone. Além disso, em consequência das mazelas sociais, a crise humanitária na Venezuela vem promovendo o aumento de circulação de pessoas na faixa de fronteira, fato que produz excesso de demanda nos serviços de saúde em Pacaraima, Boa Vista e outros municípios desse estado. Assim, a magnitude da mobilidade de pessoas nesse espaço vem fragilizando o controle sanitário, pois, oficialmente, o arcabouço fiscalizatório das instituições está concentrado na alfândega entre as cidades gêmeas (Pacaraima e Bonfim), fato que impede o controle sanitário expandido. Isso revela que os problemas na linha de fronteira se estendem a regiões mais distantes, inclusive, para outros estados da Federação, mostrando que as questões de fronteira não podem ser tratadas como um problema localizado.

Por isso, a malária é um dos principais problemas de saúde pública na Amazônia, incluindo o estado brasileiro de Roraima que registra um dos piores níveis de incidência dessa doença na região. Como esse agravo é influenciado por fatores de diferentes naturezas (ambiental, socioeconômica, etc.), o conhecimento da dinâmica espaço-temporal dos casos de malária pode esclarecer informações importantes sobre a relação entre esses fatores. Desta forma, a partir da análise da distribuição temporal da malária em Roraima é possível observar que importantes eventos ocorreram durante o período de 2009 a 2018.

Para caracterizar a malária em Roraima, é necessário considerar as particularidades de cada município. Desta forma, podemos dividir o estado em dois grupos de municípios: os que apresentam maior número de casos autóctones e os que têm maior concentração de malária importada. O grupo dos municípios com maior prevalência de casos autóctones apresenta diversidade quanto ao local de infecção que pode ser: procedente de zona rural, a exemplo do município de Cantá; da zona urbana, como é o caso de São João da Baliza e originário de área indígena, presente na maioria dos municípios, contribuindo para a manutenção de elevadas taxas de malária nos municípios que abrigam estas populações. Além disso, as ações de controle e combate da malária em área indígena, acontecem à revelia dos municípios, mas as notificações entram na estatística do município.

Para ilustrar esta situação, em 2019, o município de Alto Alegre, registrou 5.780 casos de malária dos quais 5.477 (94,8%) vieram da área indígena. Iracema, nesse mesmo ano, notificou 1.184 casos de malária, sendo 889 (75,1%) da área indígena, situação que se repete em vários municípios (7). Em situação contrária, o município de Cantá, registrou 1.639 casos de malária, desses, apenas 179 foram notificados em área indígena, correspondendo a 10,9% do total. Sendo a maioria da malária nesse município procedente da zona rural. Por sua vez, São João da Baliza em 2019, apresentou 550 casos, dos quais 310 (56,4%) foram produzidos em área urbana (7). Além dessas características regionais, todos os municípios, embora com baixa frequência, registraram malária importada (7). Estas características regionais mostram a diversidade na dinâmica dessa doença entre os municípios, condição que deve ser considerada no processo de intervenção das ações de controle da malária.

Essa dinâmica no processo de transmissão autóctone é capaz de incrementar e manter a circulação da doença entre os municípios, pois, nem sempre o diagnóstico e notificação da malária ocorrem no mesmo local ou município de infecção, mostrando que há um movimento intermunicipal de pessoas em busca de assistência. Boa Vista é um bom exemplo, pois dentre todos os municípios, foi o que mais apresentou notificações de malária procedentes de outras regiões do estado. O movimento intermunicipal acaba dificultando o controle da malária, porque as áreas limítrofes são extensas, múltiplas e de difícil acesso, gerando demanda além da capacidade operacional que os municípios podem oferecer. Essa mobilidade é um aspecto importante na cadeia de transmissão considerando o potencial de receptividade ambiental de cada município, inclusive com presença de criadouros nos espaços urbanos.

Por isso, vários aspectos que envolvem a operacionalização das ações de controle da malária podem determinar a sua manutenção ou a sua eliminação em um município. Nesse sentido, é essencial ter infraestrutura adequada, recursos humanos suficientes e gestão qualificada, que sejam sensíveis à importância das atividades da equipe de endemia para o manejo ambiental, respeitando e particularizando tais ações de acordo com a realidade de cada município. No entanto, apesar da importância da gestão ambiental não existem, no Sistema de Vigilância denominado Sistema de Informação e Controle de Vetores (VETORES-MALARIA), registros atualizados dos criadouros, suas características (pH, turbidez da água) bem como uma análise dos vetores em seus estágios imaturos e adultos. Além disso, não há monitoramento de criadouros usando a tecnologia do Sistema de Informações Geográficas (GIS), como uma ferramenta de geoprocessamento

que permite uma avaliação qualificada da epidemiologia da malária, que é de importância fundamental para o monitoramento das ações de saúde largamente referendado em vários estudos (160-164).

Estas características dos municípios revelam a complexidade, tanto na gestão quanto na operacionalização, das ações de controle da malária local. Somado a isso a maioria dos municípios ainda precisa lidar com a malária, vinda de outros estados da federação e de outros países. Nesse contexto da malária importada, a sua distribuição em Roraima é ampla. Porém, a maior frequência se concentra apenas em dois dos quinze municípios do Estado, que nos últimos três anos aumentaram a frequência desse tipo de malária, seguindo a tendência global na América do Sul e na África (1). O fenômeno que produziu esse aumento precisa ser investigado, embora, o comportamento da malária importada em Roraima tem uma relação histórica com as atividades de mineração.

Nesse contexto, a malária importada vem principalmente dos países que fazem fronteira com o estado de Roraima, a Guiana e a Venezuela. Este último, foi o país que mais contribuiu com a introdução, principalmente, da malária por *P. falciparum*. A circulação desse plasmódio constitui um problema de saúde, considerando a complexidade da dinâmica da fronteira entre Brasil e Venezuela. Por isso, é fundamental que as instituições de controle sanitário estabeleçam monitoramento sistemático no intuito de conter a interiorização do *P. falciparum*. As experiências exitosas de outros países que têm perfil semelhante a esse espaço de fronteira devem servir de modelos na implementação de medidas de controle de modo a reduzir a circulação dessa espécie de plasmódio no estado ou mesmo a reintrodução em municípios que já o haviam eliminado. (30,95) Segundo alguns estudos, a reintrodução da malária é um fenômeno que ocorre com frequência em vários países ao redor do mundo, sobretudo em regiões de fronteira. Geralmente a reintrodução ocorre por múltiplos fatores dentre eles, a receptividade local, onde o meio ambiente é favorável ao desenvolvimento do vetor (165-168)

A malária importada em Roraima pode estar associada a dois fenômenos: o garimpo ilegal localizado principalmente na Venezuela e Guiana e ao movimento migratório venezuelano iniciado em 2013 gerado pela crise social e econômica na Venezuela. Roraima tem uma relação estreita e antiga com as atividades de mineração, haja vista que o desenvolvimento social, cultural e econômico do Estado, historicamente, esteve associado à presença de garimpeiros vindos de várias regiões do país (98, 99, 101-103). Estudos que retrataram a malária na década de 1980, mostram que o garimpo movimentou um grande fluxo de pessoas no estado nessa década e como reflexo dessa mobilidade intensa, triplicou

o número de casos de malária (n=13.590) no ano de 1981, sendo que, nessa época 97,5% da malária notificada no Brasil foram produzidas na região Amazônica (98,106). Esta concentração está associada à forma de ocupação dessa região que recebeu diversos incentivos governamentais para desenvolvimento de projetos agropecuários, hidrelétricas e instalação de inúmeros garimpos, o que reforça relação histórica do garimpo e a malária no estado de Roraima (97, 98).

Já na década de 1990, a malária concentrava-se apenas em 79 municípios da região Amazônica, sendo que a maioria dos casos de malária também estava relacionado com as atividades de mineração nessa região (98). Na década seguinte, houve redução na incidência da malária no estado, fato que pode estar atrelado à repressão sistemática dos garimpos ilegais em área indígena em Roraima. Como repercussão da vigilância sistemática pelos órgãos de fiscalização, houve o deslocamento desses garimpeiros para as regiões de mineração da Venezuela, Guiana, Suriname e Guiana Francesa, trazendo como consequência o aumento da malária importada na última década. Porém, nos últimos três anos, entre 2016 a 2018, em virtude do afrouxamento da fiscalização aliado à crise econômica no Brasil, houve aumento extraordinário do garimpo ilegal, sobretudo em terra indígena Yanomami, que somada a outras áreas protegidas, atualmente estão catalogados 862 pontos de garimpo ilegal (105).

Como consequência das atividades de mineração, houve aumento da malária em algumas comunidades indígenas Yanomami localizadas próximas aos garimpos, especialmente no Polo Base Waikás que atende 194 indígenas distribuídos em quatro comunidades. No entorno dessas comunidades, garimpos ilegais se multiplicam criando situação de risco para os indígenas, inclusive, expostos a indivíduos com malária num ambiente com presença de criadouros. Em 2017 estas comunidades registraram apenas 10 ocorrências de malária, aumentando em 2018 para 92 casos, já em 2019, ocorreu um pico de 1.157 casos de malária resultando num IPA de 5.964 (7).

Contudo, a dinâmica atual da malária importada e autóctone produzida em região de garimpo, coloca o estado em situação de alerta, pois de um lado se tem malária autóctone procedente de garimpos ilegais de área indígena, cujo, enfrentamento depende da atuação dos órgãos federais (Polícia Federal, IBAMA), por um outro fluxo se tem a malária importada vinda de diversos países, sem que tenha intervenção bilateral para seu controle. Segundo a Organização Mundial de Saúde a maioria desses países tem registrado tendência de alta, especialmente o estado de Bolívar na Venezuela, que tem apresentando altas taxas de malária procedentes de região de garimpo (1). Essa relação da malária com atividades

de mineração é uma realidade em vários países no mundo, em 2010, a Guiana Francesa registrou 70 casos de malária por *P. vivax* entre as forças armadas francesas em missão de repressão ao garimpo ilegal (155). Outros estudos, também comprovam a relação do garimpo com malária, haja vista que em Papua, Nova Guiné, a implementação de medidas de controle em região de garimpo, promoveu a redução da malária após intervenção sistemática (169). Esses estudos reforçam a associação da malária com o garimpo, a exemplo de Gana, Costa do Marfim e Suriname que comprovaram a relação da incidência da malária com atividades de mineração (170-173). Porém, em Roraima não se pode atribuir tal relação apenas com o garimpo, pois o movimento migratório é outro fenômeno que pode ter conexão com a malária importada no estado de Roraima iniciado em 2014 com aumento extraordinário desse movimento em 2018.

A mobilidade humana consiste em atividade ancestral que gera um movimento migratório desencadeado por diversas situações (174,175). Nos tempos atuais, tal mobilidade ultrapassa as fronteiras entre países e cria um fenômeno de magnitude global. Regionalmente, tem-se um peculiar fluxo migratório originado pela crise política, social e econômica da Venezuela em 2013, que desencadeou uma crescente imigração de venezuelanos para além dos países fronteiriços (174,175). Essa crise humanitária pode ter influenciado o aumento da malária na Venezuela, pois nos últimos anos foram notificados 240.613 casos em 2016, mantendo uma curva ascendente em 2018 com percentual de aumento de 65.2% (n=319.765). Este aumento foi registrado, principalmente no estado de Bolívar, na Venezuela, fronteira com Roraima, apresentando-se como região de alta concentração de garimpos ilegais (1,72). A proximidade com uma região que apresenta altas taxas de malária somado à crise humanitária pode ter sido determinante para o aumento da malária importada e autóctone em Pacaraima.

Um dado curioso desse município que pode representar um forte indício dessa relação é o fato dessa doença ter aumentando significativamente nas terras indígenas da região de São Marcos. Parte dessa região é formada por um complexo de comunidades situadas às margens da BR 174 que liga esse município à cidade de Boa Vista. Nos últimos três anos foi registrado um grande fluxo migratório em direção a várias regiões do Brasil e da América do Sul tendo como rota esta rodovia. Esse percurso, muitas vezes é realizado a pé por pessoas que acabam tendo contato com os indígenas dessas comunidades. Até o ano de 2012, antes da crise, o risco de transmissão era baixo (IPA=3,2), porém, nos anos subsequentes teve um aumento extraordinário de 836,9% (n=1.471) casos de malária, permitindo, como hipótese, fazer a associação desse aumento com a imigração (7).

Corroborando com tal hipótese, a nossa pesquisa de campo realizada em Pacaraima, mostra que dos 648 indivíduos entrevistados 83% são venezuelanos, permitindo especular que em Roraima, ou pelo menos em Pacaraima esse aumento tem relação com o movimento migratório venezuelano. Além disso, entre os anos 2019 e 2020, a fronteira entre Brasil e Venezuela, foi fechada diversas vezes por conflitos entre a população de Pacaraima e venezuelanos, fato amplamente divulgado na mídia nacional e internacional. A malária importada nesse município caiu drasticamente, uma vez que em 2019 foram notificados apenas 200 casos de malária contra 2.137 em 2018, redução de 95,5%. Estabilizando em patamares baixos até meados de 2020 quando foram registrados apenas 59 casos, apontando que nesse município a malária está associada à presença dos venezuelanos.

Boa Vista é o outro município que recebe anualmente uma grande quantidade de pessoas vindas de região de garimpo, principalmente da Venezuela e da Guiana. Diferentemente de Pacaraima, não é seguro estabelecer a relação da malária notificada nesse município com o movimento migratório venezuelano, pois no SIVEP, não há identificação da nacionalidade dos pacientes. Isso pode ser visto como uma fragilidade do sistema que além dessa questão ainda apresenta atrasos na atualização dos dados e incoerência de informação. Um exemplo é a baixa quantidade de indivíduos que se declaram garimpeiros quando comparado com a incidência da malária proveniente de região de mineração, dados que destoam da nossa pesquisa de campo, que mostra um grande fluxo de pessoas procedentes de região de garimpo.

Além disso, de um universo de 520 entrevistados, apenas 4% se declararam venezuelanos, fato que mostra que malária em Boa Vista não está associada ao movimento migratório venezuelano. Contudo, todos os municípios apresentaram aumento da malária importada, fato que coincide com a interiorização dos venezuelanos, mostrando que a mobilidade entre os municípios pode ser um problema para controle da malária em virtude do potencial de receptividade encontrado em todos os municípios. Esse aumento pode ter ou não relação com o movimento migratório por isso a importância em descobrir o quem está provocando tal aumento.

Por certo, o controle da malária deve considerar aspectos sociais, a mobilidade humana em especial, com um grau de importância elevado. Pois não é somente o controle da tríade (hospedeiro humano, agente/vetor e meio ambiente) que levará ao êxito na redução dos casos. É essencial buscar compreender o indivíduo não somente como um reservatório, mas como um ser social com interações e movimentações que necessariamente condicionam ou determinam a incidência da malária.

Com objetivo de avaliarmos a prevalência e a distribuição das espécies plasmodiais nos municípios de maior notificação de casos importados (Boa Vista e Pacaraima) e autóctones (Baliza/Rorainópolis) de Roraima, diagnóstico parasitológico, molecular e sorológico foram utilizados.

Em geral, a espécie de *Plasmodium* predominante no Brasil é o *P. vivax*, contribuindo com cerca de 87,3% da infecção (7). Roraima não é diferente, a maioria dos casos autóctones observados em nosso estudo foram infecções por *P. vivax* (principalmente em São João da Baliza/Rorainópolis), enquanto infecções por *P. falciparum* foram mais prevalentes em Pacaraima e Boa Vista. Conforme esperado, o diagnóstico molecular foi superior à gota espessa, diagnosticando um maior número de casos de infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*) e por *P. malariae*.

O *P. malariae* foi detectado em baixa frequência embora esta espécie esteja presente na Venezuela e nas Guianas. Em Roraima nos últimos dez anos, foram detectados apenas três casos dessa espécie. No Brasil, esse *Plasmodium* é subnotificado na maioria das áreas endêmicas, devido à falta de microscopistas treinados, como também pela dificuldade da identificação desta espécie no exame microscópico direto da gota espessa, método de eleição para diagnóstico de malária. Entretanto, esta espécie parece ser mais comum do que o sugerido por dados oficiais baseados em microscopia. Estudos usando PCR em pacientes de Rondônia registraram uma prevalência de 10% e em Mato Grosso 11,9% (176,177).

Os dados permitiram constatar que em Pacaraima a maioria dos casos importados são de venezuelanos que se infectaram na Venezuela, o que não surpreendeu, já que este é o município fronteiro com a Venezuela. Em Boa Vista a maioria dos casos de *P. falciparum* são de brasileiros que se infectaram na Venezuela e Guiana. O grande fluxo de pacientes da Venezuela para o Brasil e outros países da América do Sul tem sido atribuído ao conflito político no país. Esse aumento nos casos de malária tem sobrecarregado os sistemas de saúde que normalmente atendem a um número menor de casos. Estudos recentes também mostraram que o aumento do número de casos de *P. falciparum* coincidem com o movimento migratório da Venezuela (160,178). O *P. falciparum* é mais comumente associado a manifestações graves da doença do que o *P. vivax* e suas opções de tratamento diferem do tratamento com *P. vivax*. Portanto, um aumento nas infecções por *P. falciparum* em um país que possui amplamente infecções por *P. vivax*, como é o caso do Brasil, tem implicações no programa de controle da malária. No Brasil, a artemeter-lumefantrina (AL) é usada no tratamento de *P. falciparum*, enquanto *P. vivax* é tratado com

cloroquina (se não houver resistência à cloroquina). Em Pacaraima e Boa Vista mais da metade dos participantes do nosso estudo relatou ser garimpeiro ou trabalhando em minas ilegais no Brasil ou nos países vizinhos (Venezuela, Suriname, Guiana Francesa ou Guiana).

Além de testes moleculares utilizou-se teste sorológico específicos para as proteínas CS do *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Estes testes podem identificar as espécies plasmodiais que circulam em uma determinada área endêmica e serem utilizados como indicadores de transmissão e exposição aos plasmódios. Contudo, o teste sorológico não serve para diagnóstico apenas como indicador de contato com o parasito já que os indivíduos com episódios de malária mantem os anticorpos por vários anos (13).

Os resultados mostraram que a resposta de anticorpos para a proteína CS de *P. vivax* prevaleceu e a variante clássica VK210 foi a mais frequente, seguido da CS de *P. falciparum*. A prevalência de indivíduos positivos para CS de *P. malariae*, foi detectada em um pouco mais da metade da população. Embora, nem a gota espessa nem o exame molecular tenham detectado essa espécie em um universo de 1.329 amostras, ainda assim é possível dizer que há indícios que o *P. malariae* circule em Roraima.

Dentre os Estados do norte, Roraima é o que mais notifica malária importada, isso pode levar a supor que os indivíduos (50,9%) tenham adquirido esse tipo de plasmódio nos países circunvizinhos que sabidamente têm *P. malariae*. Contudo, há muitos relatos dos entrevistados em nosso estudo que afirmaram nunca ter adquirido malária fora do Brasil. Rorainópolis e São João da Baliza são dois municípios com baixíssima ocorrência de malária importada, com apenas dois casos detectados nesse estudo e em ambos os municípios, de 158 amostras testadas, 77 (48,9%) apresentaram anticorpos para a CS de *P. malariae*. Vários trabalhos relatam que a produção de anticorpos anti-CS não está relacionada à presença na circulação do parasito no estágio sanguíneo. As infecções sanguíneas atuais ou recentes parecem ter pouco impacto na soropositividade e não parecem aumentar a resposta anti-CS, pois a prevalência e os níveis de anticorpos anti-CS não foram significativamente diferentes entre indivíduos positivos e negativos para o parasito em nosso trabalho e em outros trabalhos publicados (11,179-181).

Um dado curioso sobre o *P. malariae* é a sua capacidade de persistir ao longo dos anos, se manifestando de forma crônica, porém, de baixíssima parasitemia e, geralmente, assintomático. Essa condição de cronicidade pode apresentar riscos de recorrência muitos anos depois, mesmo que o reservatório esteja distante de regiões maláricas (182,183). Segundo alguns autores, a baixa frequência dessa espécie pode estar associada à presença

de anticorpos com reação cruzada entre os *P. vivax*, *P. falciparum* ou com o plasmódio simiano, *P. brasilianum*. Uma vez que esse último apresenta repetições de CS com sequências idênticas ao *P. malariae*, fato que também pode explicar nosso resultado (180, 182, 184).

Em relação às respostas dos anticorpos da proteína CS associada com infecção atual ou recente, não encontramos diferenças nos resultados, o que mostra que a respostas dos anticorpos independe da positividade recente ou antiga, nem influencia no índice de reatividade dessas respostas, nem entre indivíduos negativos e positivos no estágio sanguíneo. Resultado convergente com outros estudos que avaliaram as respostas da CS com as três espécies igualmente testadas no nosso estudo (185-189). Além disso, a maioria dos indivíduos entrevistados apresentou vários episódios de malária com recidivas, sendo que parte deles foi reinfeção pois regressaram ao local de infecção, outra parte foi recaída e em menor frequência recrudescência todas relacionadas com o *P. vivax*, que comumente apresenta recidivas. O termo “recidiva” está relacionado à recorrência ou quantidade dos episódios de malária que acomete um indivíduo num determinado período. Desta forma, o tempo é importante para a classificação ou subdivisão da recidiva em recrudescência, recaída e reinfeção (190-192). Para tal classificação sempre haverá necessidade de estabelecer um marco temporal com identificação do “caso índice”, que vai desencadear o processo de recorrência. Embora não haja consenso acerca das variações da recidiva, sobretudo em relação ao tempo transcorrido, o Ministério da Saúde, considera que: a recidiva ocorrida entre 7 a 28 dias após o tratamento é denominada de recrudescência; quando essa recidiva ocorre entre 29 a 60 dias ela é classificada como recaída e quando essa recidiva extrapola o tempo de 60 dias após o tratamento pode ser identificada como uma reinfeção (190-192).

Nesse estudo o índice de reatividade (IR) da proteína CS associado ao local provável de infecção (autóctone/importado), apresentou pouca diferença entre as respostas dos anticorpos, não sendo possível provar que a origem da malária possa ter influenciado no IR. Contudo, em outro estudo as respostas de anticorpos anti-CSP modifica-se de acordo com a transmissão sazonal e geográfica (13). No nosso estudo o IR referente ao tempo (< 1 ano) foi maior entre os casos importados, para a maioria das repetições, e entre o IR de 1.0 a 3.0 foi mais frequente na malária autóctone.

A resposta da proteína CS, em nosso estudo, também foi correlacionada com a idade e o sexo. No resultado, indivíduos na faixa etária de 44 anos apresentaram maior índice de responsividade. É possível que essa diferença em relação às outras idades possa ser

explicada pelo fato de os indivíduos estarem entre a faixa etária que mais estão expostos aos ambientes maláricos. Estudos associam a intensidade na resposta imune humoral de um anti-esporozoíto, em indivíduos com infecção em estágio sanguíneo, conforme o aumento da idade (186,193,194). Além da relação com a idade, os homens apresentaram maior responsividade em todas as repetições, resultado divergente de outro estudo, que não se observou a relação entre anti-esporozoítos (CS) e o sexo (195).

Considerando os resultados dos exames de microscopia (gota espessa) e molecular, a distribuição da malária em Roraima foi semelhante aos demais estados que compõem a Região Amazônica. Contudo, houve divergência quando se analisa a frequência por espécies plasmodiais, pois em Roraima a incidência do *P. falciparum* foi maior que os demais estados. Já a soroprevalência da proteína CS, apresentou características comuns entre alguns estados dessa região, mostrando que a população foi mais exposta ao *P. vivax* seguido do *P. falciparum* e *P. malariae*. Embora essa última espécie tenha tido baixíssima frequência de infecção no estágio sanguíneo, fato que revela uma fragilidade no exame de gota espessa, técnica de escolha, para o diagnóstico da malária no Brasil. Nesse sentido, é importante viabilizar a implementação de técnicas mais sensíveis como protocolo em laboratórios com capacidade de realizar exame molecular, ou ainda a elaboração de um estudo de coorte em um inquérito por meio de diagnóstico molecular em todos os municípios visto que o Brasil vislumbra a eliminação da malária.

A soroprevalência da proteína CS indica sua presença em várias regiões do mundo. A variante *P. vivax*, VK210 foi descrita no Brasil, Índia, Tailândia e Peru. (11) No Brasil, foram identificadas as três variantes do *P. vivax*, incluindo os estados Amazonas, Pará, Rondônia, Mato Grosso, Acre e Amapá (196-198). Resultados semelhante ao encontrado nessa pesquisa.

Inúmeros estudos conduzidos em área endêmica de malária com diferentes situações epidemiológicas revelaram que, os níveis e a soroprevalência de anticorpos para esporozoítos são altos, principalmente para proteína CSP de *P. falciparum*, com efeito cumulativo de infecções repetidas e com a idade e como indicador de intensidade de transmissão. Entretanto, pouco se sabe sobre a persistência dessa resposta ao longo do tempo quando a transmissão da malária é interrompida. A resposta humoral antiplasmodial tem sido utilizada para medir a intensidade de transmissão da malária e está sendo cada vez mais incorporada em estudos transversais e longitudinais para monitorar mudanças na transmissão, e identificar novos “hotspots” de transmissão e grupos de alto risco em áreas endêmicas da África, Ásia e Região Amazônica (13).

Particularmente, sobre Boa Vista é importante ressaltar que é o município com maior número de casos de malária importada do estado. Esse município apresenta boa estrutura no serviço de saúde e no comércio, condição que atrai garimpeiros, além de indivíduos de diversas regiões do estado, o que revela Boa Vista como o município que mais notifica malária importada ou de precedência de vários municípios de Roraima e vários estados de federação. De fato, este estudo mostra que a maioria dos casos notificados na Unidade de Saúde da área urbana de Boa Vista, no período deste estudo, foram importados da Venezuela e Guiana com poucos casos autóctones (1,7%), conforme observado anteriormente (7). Além disso, a grande maioria desses casos importados (90,4%) eram de brasileiros vindos dos garimpos de ouro (90,4%) na Venezuela e Guiana, em vez de migrantes desses países. No geral, os garimpeiros correm maior risco de contrair malária, tornando-os uma subpopulação com maior risco de infecção por *Plasmodium*.

Os garimpeiros brasileiros passam parte de seu tempo entre as minas de ouro no exterior, principalmente na Venezuela e Guiana e em Boa Vista, onde vivem (98,3%) e vendem os produtos dessa mão de obra, gerando alta mobilidade entre áreas endêmicas da Venezuela e Guiana até Boa Vista. Consistente com essas observações, a malária importada nos últimos anos aumentou exponencialmente à medida que as atividades de mineração de ouro aumentaram em 2018 e o ouro foi o segundo produto mais exportado no estado (172,173, 199). Atualmente, existem 1.097 pontos de mineração ilegal localizados na Venezuela, Guiana e Brasil (terras indígenas Yanomami), produzindo alta mobilidade de pessoas em busca de emprego (199). Embora essas regiões de mineração sejam geralmente insalubres e perigosas, elas fornecem um incentivo econômico que motiva o retorno desses indivíduos em busca de sobrevivência, embora ainda em risco de adquirir malária. No geral, a situação observada em Roraima é consistente com relatórios emergentes de outras áreas endêmicas nas Américas (2, 200-202).

Os resultados desse estudo indicam que existem vários criadouros positivos para *An. darlingi* e *An. albicans* em Boa Vista. Além disso, encontramos indivíduos assintomáticos (4,3%) e o “tempo de início do tratamento dos pacientes após a data dos primeiros sintomas” foi superior a 48 horas para 60% dos pacientes. Esses fatores podem aumentar o risco de transmissão local após a introdução da malária. Essa situação requer aumento da vigilância, evidenciado pelo aumento de 1.300% nos casos autóctones em Boa Vista em 2018. É importante ressaltar que os serviços de saúde de Boa Vista atraem migrantes de outros municípios e cidades fronteiriças em busca de tratamento da malária e a localização da cidade favorece o movimento de pessoas e bens. Essas características

criam um fluxo contínuo entre as áreas de mineração e Boa Vista. A relação entre a mobilidade das pessoas e a malária importada tem sido apontada em vários estudos como uma preocupação para o controle e eliminação da malária. Nesse caso, a mobilidade está ligada aos garimpeiros (4,203). A implementação de medidas para reduzir o risco de transmissão autóctone, visando o *hotspot* representado pelos garimpeiros, deve ser fortemente considerada em Boa Vista.

Vale ressaltar que não observamos infecções autóctones por *P. falciparum*, embora nosso número tenha sido baixo ($n = 5$). No entanto, dados do Ministério da Saúde, SIVEP-Malária apontam 14 casos de *P. falciparum* importados em Boa Vista nos últimos três anos (10). Os casos importados de *P. falciparum* apresentam uma distribuição incomum em outros estudos, afetando cerca de 2 em cada 5 indivíduos examinados, um motivo de preocupação, pois há o risco de introdução e disseminação de cepas resistentes de *P. falciparum* dos países vizinhos do Brasil (95).

Portanto, a malária importada em área urbana de Boa Vista é introduzida por brasileiros que trabalham na extração de ouro em diversas minas dentro e fora das fronteiras internacionais desse estado. Por isso, é possível que a origem da malária importada na região oeste de Boa Vista esteja associada às atividades de mineração e não com o movimento migratório. Apesar do baixo número de casos autóctones, uma situação que merece atenção é o fato da movimentação dos indivíduos infectados procedentes de áreas endêmicas, circular próximo aos criadouros nos espaços urbanos de Boa Vista. Fato que aponta para a existência de um potencial risco de aumento da malária autóctone, incluindo o risco de introdução da malária *P. falciparum*. Dessa forma, a detecção precoce dos casos de malária é necessária para limitar seu potencial impacto negativo no cumprimento das metas do plano de eliminação proposto pelo Ministério da Saúde do Brasil.

8 CONCLUSÃO

Em linhas gerais, os temas tratados nessa tese representaram vários aspectos epidemiológicos da malária no estado de Roraima aqui analisados a partir do local provável de infecção. Na caracterização da malária foram analisados o perfil sociodemográfico e epidemiológico, a soroprevalência das principais espécies plasmodiais que circulam ou às quais a população do estado já tenha sido exposta. Além disso, buscou-se entender os determinantes com potencial para modificar essa epidemiologia no espaço e no tempo.

Conclui-se que:

- Na maioria dos municípios a malária autóctone prevalece,
- Pacaraima e Boa Vista apresentaram baixo índice de transmissão local e maior registro de malária importada;
- Em Pacaraima prevaleceu a malária procedente da Venezuela trazida por venezuelanos;
- Em Boa Vista a malária é trazida por brasileiro oriundo de garimpos da Venezuela seguido da Guina;
- Todos os municípios localizados às margens da BR-174 (Boa Vista, Mucajaí, Iracema, Caracará e Rorainópolis), curiosamente, registraram malária importada com procedência da Venezuela;
- Os nossos dados permitiram mostrar que em São João da Baliza/Rorainópolis, os casos de malária são majoritariamente autóctones.
- A variante do *P. vivax* VK 210 foi prevalente no nesse estudo e *P. malariae* foi verificada na metade da população estudada, embora, no exame de gota espessa e molecular não tenha sido detectado este tipo de plasmodium;
- A análise espacial dos casos de malária e dos criadouros de vetor em uma área urbana de Boa Vista mostrou que a malária nestes municípios é impulsionada por brasileiros que trabalham em minas de ouro da Venezuela e Guiana.
- Há risco no aumento da transmissão da malária na zona oeste da cidade de Boa Vista em razão do aumento de indivíduos com malária importada circulando nas proximidades dos diversos criadouros identificados no aperimento urbano e periurbano desse município;
- As interações existentes na tríplice fronteira norte entre Roraima, Guiana e Venezuela geram movimentos de pessoas e mercadorias intensificando o comércio legal e ilegal de combustível e do ouro extraído das minas existentes

nessa região. Essa movimentação pode estar associada ao aumento da malária importada em Roraima, revelando um grande problema de saúde de difícil controle sanitário que merece atenção, esforços e cooperação entre esses países.

A malária é uma doença de múltiplos fatores distribuídos em diversos ambientes de cada município. Por essa razão, a contenção da malária no estado exige vários olhares e manejo particularizado tanto para malária importada de outros países e de procedência de outros municípios quanto às de origem local. Por isso, a importância de se manter uma vigilância efetiva nas fronteiras, implementando um protocolo para diagnóstico e tratamento precoce da malária de indivíduos que adentram no estado.

A partir das percepções dessa pesquisa algumas fragilidades foram observadas na rotina. Assim, mostra-se relevante recomendar o que se segue:

- Inclusão da nacionalidade no SIVEP. O atendimento aos estrangeiros é garantido por lei. Isso não pode ser motivo de constrangimento, mas pode ser crucial para medidas de controle;
- Recomenda-se ação efetiva de controle sanitário na fronteira. Em Pacaraima existe um laboratório sentinela de fronteira gerido pela Secretaria de Saúde do Estado que está ocioso, pois, os estrangeiros com malária, exceto emergência, são atendidos no laboratório de malária do município;
- Criar um sistema de monitoramento robusto com ferramentas de geoprocessamento e manejo dos criadouros com investimento considerável nos serviços de endemias;
- Investir em recursos humanos e equipamentos, por exemplo, o laboratório de malária em Boa Vista funciona numa policlínica do estado. O espaço é inadequado e a equipe é insuficiente frente à alta demanda.
- Material de educação em saúde bilíngue (português/espanhol) inclusive a ficha de notificação também em espanhol ou mesmo um roteiro de entrevista para melhorar a qualidade da informação.

Perspectivas

- Ampliar a avaliação de risco de transmissão além da zona oeste da cidade de Boa Vista;
- Ampliar a sorologia para outros municípios;

- Pesquisa sobre recidivas, com avaliação a partir dos determinantes e condicionantes sociais, com ênfase no comportamento das reinfecções causadas pelo *P. vivax* em indivíduos residentes no município de Boa Vista, RR, com históricos de múltiplas malárias (Projeto em construção);
- Projetos em fase de construção em comunidades indígenas: Analisar os eventos que influenciaram no aumento da malária nos polos bases de Waikás, Uraricoera e Paapiu Novo em Terra Indígena Yanomami, e no polo base Sorocaima II na Terra Indígena São Marcos, nos anos de 2018 e 2019.
- Analisar as representações sociais da malária na perspectiva dos garimpeiros que buscam atendimento na Policlínica Cosme e Silva em Boa Vista. (Projeto em construção).

Anexos:

No desfecho final, surgiram alguns produtos resultantes dessa pesquisa:

- 01 artigo publicado;
- 02 artigos em fase final de elaboração;

Outras publicações científicas (em anexo)

- ✓ Kudyba, Heather M.; **Louzada, Jaime**; Ljolje, Dragan; Kudyba, Karl A.; Muralidharan, Vasant; Oliveira-Ferreira, Joseli; Lucchi, Naomi W. Field evaluation of malaria malachite green loop-mediated isothermal amplification in health posts in Roraima state, Brazil. *Malaria Journal*, v.18, p.98 - , 2019.
- ✓ Lucchi, Naomi W.; Abdallah, Rispah; **Louzada, Jaime**; Udhayakumar, Venkatachalam; Oliveira-Ferreira, Joseli. Molecular Surveillance for Polymorphisms Associated with Artemisinin-Based Combination Therapy Resistance in Plasmodium falciparum Isolates Collected in the State of Roraima, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v.102, p.310 - 312, 2020.

9 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. World Malaria Report 2019. Geneva: WHO; 2019. Available from: https://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/.
2. Espinoza JL. Malaria Resurgence in the Americas: An Underestimated Threat. *Pathogens*. 2019 Jan;8(1): 1-4.
3. Grillet ME, Hernandez-Villena JV, Llewellyn MS, Paniz-Mondolfi AE, Tami A, Vincenti-Gonzalez MF, et al. Venezuela's humanitarian crisis, resurgence of vector-borne diseases, and implications for spillover in the region. *Lancet Infect Dis* 2019 May;19(5):149-61.
4. Daniels JP. Increasing malaria in Venezuela threatens regional progress. *Lancet Infect Dis* 2018 Mar; 18(3):257.
5. Unicef. Crise migratória venezuelana no Brasil. 2019. Available from: <https://www.unicef.org/brazil/crise-migratoria-venezuelana-no-brasil>.
6. Wangdi K, Gatton ML, Kelly GC, Clements ACA. Cross-border malaria: a major obstacle for malaria elimination. *Adv Parasitol*. 2015 Jun;89:79-107.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Notificação de casos. 2020. Available from: http://portalweb04.saude.gov.br/Sivep_malaria/ [Internet].
8. Pribluda VS, Barojas A, Anez A, Lopez CG, Figueroa R, Herrera R, et al. Implementation of basic quality control tests for malaria medicines in Amazon Basin countries: results for the 2005-2010 period. *Malar J* 2012 Jun; 1-11.
9. Andrade BB, Reis-Filho A, Barros AM, Souza-Neto SM, Nogueira LL, Fukutani KF. Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. *Malaria J* 2010 May; 9:1-11.
10. Ministério da Saúde (Brasil). Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2020.
11. Arruda ME, Zimmerman RH, 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 Jun; 102(3): 367-71.
12. Costa MR, Vieira PP, Ferreira CO, Lacerda MV, Alecrim WD, Alecrim M. Molecular diagnosing of malaria in a tertiary care center in the Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008 Ago;41(4):381-5.
13. Kusi KA, Bosomprah S, Dodoo D, Kyei-Baafour E, Dickson EK, Mensah D, et al. Anti-sporozoite antibodies as alternative markers for malaria transmission intensity estimation. *Malaria J* 2014 Mar; 13(103):1-10.
14. Neves DP. *Parasitologia Humana*. 12. ed. São Paulo: Atheneu; 2011.
15. Camargo EP. Malária, maleita, paludismo. *Ciência Cult* 2003 Mar;55(1):26-9.

16. Gomes AP, Vitorino RR, Costa AP, De Mendonça EG, Oliveira MGA, Siqueira-Batista R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. Rev Bras Ter Intensiva 2011 Sept; 23(3):358–69.
17. Arroz JAH. Comunicação para a mudança social e de comportamento na luta contra a malária em Moçambique. Rev Saúde Pública. 2017 Fev; 51(18):1–6.
18. Ricci F. Social Implications of Malaria and Their Relationships with Poverty. Mediterr J Hematol Infect Dis 2012 Aug; 4(1).
19. Krefis AC, Schwarz NG, Nkrumah B, Acquah S, Loag W, Sarpong N, et al. Principal component analysis of socioeconomic factors and their association with malaria in children from the Ashanti Region , Ghana. Malar J 2010 Jul; 9:1–7.
20. Somi MF, Butler JRG, Vahid F, Njau J, Kachur SP, Abdulla S. Is There Evidence for Dual Causation Between Malaria and Socioeconomic Status ? Findings from Rural Tanzania. Am J Trop Med Hyg 2007 Dec;77(6):1020–7.
21. França TCC, Dos Santos MG, Figueroa-Villar JD. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. Quim Nova. 2008 Abr;31(5):1271–8.
22. Hempelmann E, Krafts K. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. Malar J 2013 Jul;12(232):1–13.
23. Camargo EP. A malária encenada no grande teatro social. Estud Av 1995 Ago;9(24):211-28
24. Gachelin G, Garner P, Ferroni E, Verhave JP, Opinel A. Evidence and strategies for malaria prevention and control: a historical analysis. Malar J 2018 Feb; 17(96):1–18.
25. Dias-Lima A. Ecologia médica: uma Visão Holística no Contexto das enfermidades humanas. Rev Bras Educ Med 2014 Fev;38(2):165–72.
26. Schlagenhauf P, Adamcova M, Regep L, Schaerer MT, Rhein HG. The position of mefloquine as a 21st century malaria chemoprophylaxis. Malar J 2010 Dec; 9(357):1-15.
27. Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz JF, et al. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. Cell Host Microbe 2008 Feb;3(2):88-96.
28. Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. Cell Microbiol 2007 Jan; 9(5):1215-22.
29. Mehlhorn H. Encyclopedia of Parasitology. 3 ed. Local (cidade): Springer; 2008.
30. Krotoski, Wojciech A. et al. Relapses in primate malaria: history of two populations of exoerythrocytic stages. Preliminary note. British Medical Journal 1980; 1:153-4.
31. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. Lancet 2014 Feb; 383(9918):723-35.
32. Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The Primate Malaria [CD-ROM]. Atlanta: CDC; 1971.
33. McKeon SN, Lehr MA, Wilkerson RC, Ruiz JF, Sallum MA, Lima JB, et al. Lineage divergence detected in the malaria vector Anopheles marajoara (Diptera: Culicidae) in Amazonian Brazil. Malar J 2010 Oct; 9(271):1-13.
34. Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte APM, Ríos-Velásquez CM, Melo FF,

- et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015 Feb; 110(1):23-47.
35. Póvoa MM, De Souza RTL, Lacerda RNDL, Rosa ES, Galiza D, De Souza JR, et al. The importance of *Anopheles albitarsis* e and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006 Mar;101(2):163–8.
 36. Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderon GI, Quinones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, et al. Malaria vector species in Colombia: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011 Jul;106(Suppl 1):223-38.
 37. Dusfour I, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Girod R. Incrimination of *Anopheles (Anopheles) intermedius* Peryassu, *An. (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldon, *An. (Nys.) oswaldoi* Peryassu as natural vectors of *Plasmodium falciparum* in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012 May; 107(3):429-32.
 38. Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Ponsonby DJ, Herrera M, Sallum MAM, Velez ID, et al. Systematics of the oswaldoi complex (*Anopheles, Nyssorhynchus*) in South America. Parasit Vectors 2013 Nov;6(324):1-13.
 39. De Barros FS, De Aguiar DB, Rosa-Freitas MG, Luitgards-Moura JF, Gurgel Hda C, Honorio NA, et al. Distribution summaries of malaria vectors in the northern Brazilian Amazon. J Vector Ecol 2007 Dec;32(2):161-7.
 40. Faran ME, Linthicun KJ. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). Mosq Systematics 1981;13(1):1-81.
 41. Sallum MAM, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, Dos Santos CL. Insight into *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) species from Brazil. J Med Entomol 2008 Nov;45(6):970-81.
 42. Branquinho MS, Araujo MS, Natal D, Marrelli MT, Rocha RM, Taveira FA, et al. *Anopheles oswaldoi* a potential malaria vector in Acre, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996 Jun;90(3):233.
 43. Marrelli MT, Branquinho MS, Hoffmann EH, Taipe-Lagos CB, Natal D, Kloetzel JK. Correlation between positive serology for *Plasmodium vivax*-like/*Plasmodium simiovale* malaria parasites in the human and anopheline populations in the State of Acre, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998 Apr;92(2):149-51.
 44. Marrelli MT, Honorio NA, Flores-Mendoza C, Lourenço-de-Oliveira R, Marinotti O, Kloetzel JK. Comparative susceptibility of two members of the *Anopheles oswaldoi* complex, *An. oswaldoi* and *An. konderi*, to infection by *Plasmodium vivax*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999 Aug;93(4):381-4.
 45. Quinones ML, Ruiz F, Calle DA, Harbach RE, Erazo HF, Linton YM. Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006 Sept; 101(6):617-23.
 46. Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, De Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF. Anopheline species complexes in 185 Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998 Oct;93(5):651-5.
 47. Galvão ALA, Lane J. Observações sobre alguns anofelinos de Salobra, Mato

- Grosso (Diptera, Culicidae). Rev Biol Hyg 1941; 11:10-18.
48. Galvão ALA. Chaves para a determinação das espécies do subgenero Nyssorhynchus do Brasil. Rev Biol Hyg 1944;9(19):141-53.
 49. Silva-Do-Nascimento TF, Wilkerson RC, Lourenço-De-Oliveira R, Monteiro FA. Molecular confirmation of the specific status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and evidence of a new cryptic species within *An. triannulatus* in central Brazil. J Med Entomol 2006;43(3):455-9.
 50. Chadee DD, Wilkerson RC. *Anopheles triannulatus* (Neiva and Pinto): a new *Anopheles* record from Trinidad, West Indies. J Am Mosq Control Assoc 2005; 21:316-7.
 51. Silva do Nascimento TF, Lourenco-de-Oliveira R. *Anopheles halophylus*, a new species of the subgenus Nyssorhynchus (Diptera: Culicidae) from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002 Sept; 97(6):801-11.
 52. Gabaldon A. Malariology. Malaria control in the Neotropic Region. Philadelphia: Saunders; 1949. p. 749-63.
 53. Silva-do-Nascimento TF, Lourenço-de-Oliveira R: Diverse population dynamics of three *Anopheles* species belonging to the Triannulatus Complex (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2007 Dec;102(8):975-82.
 54. Lourenco-de-Oliveira R, Luz SLB. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon--II. Vertical distribution and frequency of anopheline species inside and outside the forest. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996 Dec; 91(6):687-94.
 55. Rubio-Palis Y. Variation of the vectorial capacity of some anophelines in western Venezuela. Am J Trop Med Hyg 1994 Apr; 50(4):420-4.
 56. Deane LM, Causey OR, Deane MP. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. Rev Serviço Especial de Saúde Pública 1948 Maio;1(4):827-965.
 57. Consoli RAGB, Oliveira RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1994.
 58. Deane LM, Ribeiro CD, Lourenco de Oliveira R, Oliveira-Ferreira J, Guimaraes AE. Study on the natural history of malaria in areas of the Rondonia State-Brazil and problems related to its control. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1988 Jun;30(3):153-6.
 59. Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg 1998 Aug;59(2):325-35.
 60. Faran ME. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). A revision of the Albimanus Section of the subgenus Nyssorhynchus of *Anopheles*. Contrib Amer Ent Inst 1980;15(7):1-214.
 61. Bergo ES, Souto RNP, Galardo AKR, Nagaki SS, Calado DC, Sallum MAM. Systematic notes on *Anopheles* Meigen (Diptera: Culicidae) species in the state of Amapá, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007 Jun;102(3):373-6.
 62. Calado DC, Foster PG, Bergo ES, Dos Santos CL, Galardo AKR, Sallum MAM. Resurrection of *Anopheles goeldii* from synonymy with *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) and a new record for *Anopheles dunhami* in the Brazilian

- Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008 Dec; 103(8):791-9.
63. Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderon GI, Quinones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, et al. Malaria vector species in Colombia: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011 Aug;106 (Suppl 1):223-38.
 64. Galardo AKR, Arruda M, D'Almeida Couto AAR, Wirtz R, Lounibos LP, Zimmerman RH. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg 2007 Mar;76(3):461-9.
 65. Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Teva A, Deane LM, Daniel-Ribeiro CT. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg 1990 Jul;43(1):6-10.
 66. Hiwat H, Bretas G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. Parasit Vectors 2011 Sept; 4(177):1-13.
 67. Forattini OP. Culicidologia médica - Identificação, biologia e epidemiologia. São Paulo: EDUSP; 2002.
 68. Davis NC. A note on the malaria carrying anophelines in Belém, Pará. Rev Malariol 1931;1:43-51.
 69. Tauil PL. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011;106(Suppl 1):105-6.
 70. Pajot F, Le Pont F, Molez J, Degallier N. Agressivité d' *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) en Guyane Française. Cahiers ORSTOM ser Ent med et Parasit 1977;15:15-22.
 71. Charlwood JD, Hayes J. Variações geográficas no ciclo de picada do *Anopheles darlingi* Root no Brasil. Acta Amaz 1978 Dec; 8(4):601-3.
 72. Hudson JE. *Anopheles darlingi* Root (Diptera:Culicidae) in the Suriname rain forest. Bull Entomol Res 1984;74:129-42.
 73. Rosa-Freitas MG, Broomfield G, Priestman A, Milligan PJ, Momen H, Molyneux DH. Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. J Am Mosq Control Assoc 1992 Dec; 8(4): 357-66.
 74. Rozendaal JA. Observations on the distribution of anophelines in Suriname with particular reference to the malaria vector *Anopheles darlingi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990; 85(2):221-34.
 75. Klein TA, Lima JB. Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. J Am Mosq Control Assoc 1990 Dec;6(4):700-7
 76. Vittor AY, Pan W, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, et al. Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. Am J Trop Med Hyg 2009 Jul;81(1):5-12.
 77. Sánchez-Ribas J, Oliveira-Ferreira J, Gimnig JE, Pereira-Ribeiro C, Santos-Neves MSA, Silva-Do-Nascimento TF. Environmental variables associated with anopheline larvae distribution and abundance in Yanomami villages within unaltered areas of the Brazilian Amazon. Parasites Vectors 2017 Nov;10(1):1–15.
 78. Ianelli RV, Honorio NA, Lima DC, Lourenco-De-Oliveira R, Santos RV, Coimbra

- Junior CEA. Faunal composition and behavior of anopheline mosquitoes in the Xavante Indian reservation of Pimentel Barbosa, central Brazil. *Parasite* 1998; 5:197-202.
79. Sánchez-Ribas J, Oliveira-Ferreira J, Rosa-Freitas MG, Trilla L, Silva-do-Nascimento TF. New classification of natural breeding habitats for Neotropical anophelines in the Yanomami Indian Reserve, Amazon Region, Brazil and a new larval sampling methodology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015 Sept; 110(6): 760-70.
 80. Campos M, Alonso DP, Conn JE, Vinetz JM, Emerson KJ, Ribolla PEM. Genetic diversity of *Nyssorhynchus (Anopheles) darlingi* related to biting behavior in western Amazon. *Parasites Vectors* 2019 May; 12(242):1-9
 81. Chu VM, Sallum MAM, Moore TE, Lainhart W, Schlichting CD, Conn JE. Regional variation in life history traits and plastic responses to temperature of the major malaria vector *Nyssorhynchus darlingi* in Brazil. *Sci Rep* 2019 Mar;9(1):1–11.
 82. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Guia de gestão local do controle da malária. Módulo 2. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
 83. Espinoza JL. Malaria resurgence in the Americas: An underestimated threat. *Pathogens* 2019 Jan;8(1):1–4.
 84. Chibwana AI, Mathanga DP, Chinkhumba J, Campbell Jr CH. Socio-cultural predictors of health-seeking behaviour for febrile under-five children in Mwanza-Neno district, Malawi. *Malar J* 2009 Sept;8:1–8
 85. Deane LM. Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986;81(Suppl 2):5-14.
 86. Rocha Maria de Nazaré Almeida, Ferreira Eleonora A. P., Souza José Maria de. Aspecto histórico da malária. *Rev. Para. Med.* [Internet]. 2006 . Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-59072006000300018&lng=pt.
 87. Lourenço-de-Oliveira R, Guimarães AE, Arle M, da Silva TF, Castro MG, Motta MA, et al. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989 Sept; 84(4):501-14.
 88. Benchimol JL, Silva AFC. Ferrovias, doenças e medicina tropical no Brasil da primeira república. *História, ciência e saúde* 2008 Sept;15(3):719-62.
 89. Barreto ML, Teixeira MG, Bastos FI, Ximenes RAA, Barata RB, Rodrigues LC. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. *Lancet* 2011 May;377(9780):1877-89.
 90. Ladislau JLB, Leal MC, Tauil PL. Avaliação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na região da Amazônia Legal, Brasil, no contexto da descentralização. *Epidemiol Serv Saúde* 2006 Jun; 15(2):9-20.
 91. Tauil PL. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011 Aug;106(Suppl 1):105-6.
 92. Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACF,

- et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014 Aug;109(5):618-33.
93. Silva R, Paiva CHA. The Juscelino Kubitschek government and the Brazilian Malaria Control and Eradication Working Group: collaboration and conflicts in Brazilian and international health agenda, 1958-1961. *Hist. cienc. saude-Manguinhos* 2015 Mar;22(1):1-20.
 94. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J* 2016 May;15(284):1-18.
 95. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest* 2008 Apr;118(4):1266-76.
 96. Loiola CCP, Silva CJM, Tauil PL. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Rev Panam Salud Publica* 2002;11(4):235-44.
 97. Barata RCB. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. *Cad Saúde Pública*. 1995;11(1):128-36.
 98. Silva-Nunes M, Codeço CT, Malafronte RS, Silva NS, Juncansen C, Muniz PT, et al. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. *Am J Trop Med Hyg* 2008 Oct;79(4):624-35.
 99. Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Ratanatham, S. 2000. Status of malaria in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000;31:225-37.
 100. Roberts DR, Manguin S, Mouchet J. DDT house spraying and re-emerging malaria. *Lancet* 2000 Jul;356 (9226):330-2.
 101. Saraiva MGG, Amorim RDS, Moura MAS, Martinez-Espinosa FE, Barbosa MG. Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009 Out;42(5):515-22.
 102. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010 Apr;9:1-15.
 103. Silva PRF, Felício KS, Almeida MM, Rocha RA. A complexidade genética do urbano em Roraima. *Rev ACTA Geográfica* 2011;95-102.
 104. Vale ALF. Imigração de nordestinos para Roraima. *Estud Av* 2006 Ago;20(57):255-61.
 105. BBC News Brasil [Homepage na internet]. Roraima exporta 194 kg de ouro à Índia sem ter nenhuma mina operando legalmente. São Paulo. 2019 Jun. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/internacional-48534473>
 106. Marques AC. Migrações internas e grandes endemias. *Rev Bras de Malariologia e Doenças Trop* 1979; 31:137-58.
 107. Barcellos C, Bastos FI. Geoprocessamento, ambiente e saúde: uma união possível? *Cad Saúde Pública* 1996 Set;12(3):389-97.
 108. Pina MF, Santos SM. Conceitos básicos de Sistemas de Informação Geográfica e Cartografia aplicados à saúde. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018.
 109. Machado LO. Limites e fronteiras: da alta diplomacia aos circuitos da ilegalidade. *Revista Território* 2000; 8:9-29.

110. Costa EA. Os bolivianos em Corumbá-MS: construção cultural multitemporal e multidimensional na fronteira. *Cad de estudos culturais* 2012;4(7):17-33.
111. Brasil. Constituição Federal 19. Promulgada em 10 de outubro de 19979. Disponível em: http://www.planalto.com.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm>. Acesso em: 27 out 2020.
112. Benedetti A. Lugares de frontera y movilidades comerciales en el sur sudamericano: una aproximación multiescalar. In: Costa EA, Costa GVL, Oliveira, MAM (Org.). *Fronteiras em foco*. Campo Grande: Ed. UFMS; 2011. p.33-55.
113. Albuquerque JLC. A dinâmica das fronteiras: os brasiguaios na fronteira entre o Brasil e o Paraguai. São Paulo: Annablume; 2010.
114. Raffestin C. *Por uma geografia do poder*. São Paulo: Editora Ática; 2015.
115. Martins GIV, Martins CID, Resstel MIM, Da Silva LC, Campos TM. *Mato Grosso do Sul sem fronteiras: Características e interações territoriais Bolívia, Brasil, Paraguai*. Campo Grande: Editora Visão; 2010.
116. Araújo LTR, Silva WA, Juliano RS. Região fronteiriça e epidemiologia: Estudo da esporotricose e sua relação na dinâmica da fronteira Brasil-Bolívia. *Rev GeoPantanal* 2017 Set; 12: 97–105.
117. Farmer, P. Desigualdades sociais y enfermedades infecciosas emergentes. *Emerging Infectious Diseases* 2000 Mar;23:181-201.
118. Cuisinier-Raynal A. La frontière au Pérou entre fronts et synapses. *L’Espace Géographique* 2001; 3:213-30.
119. Machado LO. Estado, territorialidade, redes. Cidades gêmeas na zona de fronteira sul-americana. In: Silveira ML (org.). *Continente em chamas. Globalização e território na América Latina*. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira; 2005. p.243-84.
120. Eisele TP, Keating J, Swalm C, Mbogo CM, Githeko AK, Regens JL, et al. Linking field-based ecological data with remotely sensed data using a geographic information system in two malaria endemic urban areas of Kenya. *Malar J* 2003 Dec;2(44):1–17.
121. Junqueira RD. Geografia Médica ou da Saúde / Medical Geography and Geography of health. *Hygeia. Rev Bras Geográfica Médica e da Saúde* 2009 Jun; 5(8):57-91.
122. Barrett FA. 1980: Medical geography as a foster child. In Meade MS. *Conceptual and methodological issues in medical geography*, Chapel Hill, North Carolina: University of North Carolina, Department of Geography, *Studies in Geography*; 15:1–15.
123. Ramírez ML. La moderna Geografía de la Salud y las tecnologías de la información geográfica. *Revista Investigaciones y Ensayos Geográficos de la Carrera de Geografía de la Facultad de Humanidades de la Universidad Nacional de Formosa* 2009; 4:53-64.
124. Jori G. El estudio de la salud y la enfermedad desde una perspectiva geográfica: temas enfoques y métodos. *Rev Bibliográfica de geografía y ciencias sociales* 2013 Jun;1029(18).
125. Forattini OP. *Ecologia Epidemiologia e Sociedade*. São Paulo: Artes Médicas/EDUSP; 1992.
126. Koch T. *Cartographies of disease - maps, mapping and medicine*. Redlands: Esri Press; 2005.

127. López C, Yepes-Pérez Y, Hincapié-Escobar N, Díaz-Arévalo D, Patarroyo MA. What Is Known about the Immune Response Induced by *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidates ? *Front Immunol* 2017 Feb;8(126):1-23.
128. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 2006 Feb;28(1-2):51–60.
129. Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell Biology and immunology of malaria. *Immunological Rev* 2001 Mar; 240(1):297-316.
130. Cassiano GC, Furini AAC, Capobianco MP, Sorti-Melo LM, Almeida ME, Barbosa DRL, et al. Immunogenetic markers associated with a naturally acquired humoral immune response against an N - terminal antigen of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP - 1). *Malar J* 2016 Jun;15(306):1–11.
131. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to Malaria. *Clin Microbiol Rev* 2009 Jan;22(1):13–36.
132. Acevedo-Whitehouse K, Cunningham AA. Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics ? *Trends Ecol Evol.* 2006 Aug;21(8):433-8.
133. Dent AE, Bergmann-Leitner ES, Wilson DW, Tisch DJ, Kimmel R, Vulule J, et al. Antibody-Mediated Growth Inhibition of *Plasmodium falciparum* : Relationship to Age and Protection from Parasitemia in Kenyan Children and Adults. *PLoS One* 2008 Oct;3(10):1–10.
134. Pinto AYN, Ventura AMRS, De Souza JM. Resposta de anticorpos IgG *anti-Plasmodium vivax* em crianças expostas à malária, antes e após tratamento específico. *J Pediatr* 2001 Ago;77(4):299–306
135. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in Malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 2005 Sep;5(9):722–35.
136. Chakravarty S, Cockburn IA, Kuk S, Overstreet MG, Sacci JB, Zavala F. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat Med* 2007 Sep;13:1035–41
137. Spence PJ, Langhorne J. T cell control of malaria pathogenesis. *Curr Opin Immunol* 2012 May;24(4):444–8.
138. Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961 Nov;192:733-7.
139. Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Adv Parasitol* 2013;81:77–131.
140. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol* 2014 Nov;14(11):744-57.
141. Boyle MJ, Reiling L, Feng G, Langer C, Osier FH, Aspelling-Jones H, et al. Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. *Immunity* 2015 Mar;42(3):580-90.
142. IBGE. Censo Demográfico 2010. Características da população e dos domicílios: resultados do universo. Roraima: IBGE, 2011. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/> Acesso em: jun. 2020.

143. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Padronização dos métodos utilizados em pesquisa larvária de Anopheles na rotina dos laboratórios de entomologia. Nota Técnica nº 012-GPNCM/DIGES/SVS/MS. Registro Número: 25000. 2007.
144. SVS-MS. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2011. Padronização dos métodos utilizados em pesquisa larvária de Anopheles na rotina dos laboratórios de entomologia. Nota Técnica no. 012-GPNCM/DIGES/SVS/MS. Registro Número: 25000.
145. Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, DaSilva AJ, et al. Molecular Diagnosis of Malaria by Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Primers: PET-PCR. *PLoS ONE* 2013 Feb;8(2):566-77.
146. IBGE. Região de Fronteira dos municípios brasileiros. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/estrutura-territorial/24073-municipios-da-faixa-de-fronteira.html>. Acesso em: 20 outubro 2020.
147. MORSE SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995 Mar;1(1):7-15.
148. Franco VC, Peiter PC, Carvajal-Cortés JJ, Pereira RS, Gomes MSM, Suárez-Mutis MC. Complex malaria epidemiology in an international border area between Brazil and French Guiana: Challenges for elimination. *Trop Med Health* 2019 Apr;47(24):1-12.
149. Braz RM, Duarte EC, Tauil PL. Caracterização das epidemias de malária nos municípios da Amazônia Brasileira em 2010. *Cad. Saúde Pública* 2013 Maio;29(5):935-44.
150. Wangdi K, Gatton ML, Kelly GC, Clements AC. Cross-border malaria: a major obstacle for malaria elimination. *Adv Parasitol* 2015 May;89:79-107.
151. Louzada J, Almeida NCV, Araujo JLP, Silva J, Carvalho TM, Escalante AA, et al. The impact of imported malaria by gold miners in Roraima: characterizing the spatial dynamics of autochthonous and imported malaria in an urban region of Boa Vista. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2020 Jul; 115:1-10.
152. Saldanha R, Mosnier E, Barcellos C, Carbunar A, Charron C, Desconnets J, et al. Contributing to Elimination of Cross-Border Malaria Through a Standardized Solution for Case Surveillance, Data Sharing, and Data Interpretation: Development of a Cross-Border Monitoring System. *JMIR Public Heal Surveill* 2020 Sep;6(3):e15409.
153. Gomes MDSM, Menezes RAO, Vieira JLF, Mendes AM, Silva GV, Peiter PC, et al. Malaria in the borders between Brazil and French Guiana: social and environmental health determinants and their influence on the permanence of the disease. *Saude e Soc* 2020 Jun;29(2):1-14.
154. Mendes AM, Lima MS, Maciel AGP, Menezes RAO, Eugênio NCC. Malária entre povos indígenas na fronteira Brasil-Guiana Francesa, entre 2007 e 2016: um estudo descritivo. *Epidemiol e Serv saude* 2020 May;29(2):1-10.
155. Thway AM, Rotejanaprasert C, Sattabongkot J, Lawawirojwong S, Thi A, Hlaing TM, et al. Bayesian spatiotemporal analysis of malaria infection along an international border: Hlaingbwe Township in Myanmar and Tha-Song-Yang District in Thailand. *Malar J* 2018 Nov; 17(428):1-15.

156. Geng J, Malla P, Zhang J, Shiling X, Cuiying L, Yan Y, et al. Increasing trends of malaria in a border area of the Greater Mekong Subregion. *Malar J* 2019 Sept; 18(309):1-10.
157. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. *Malar J* 2017 Jul;16(1):1–18.
158. Lai S, Sun J, Ruktanonchai NW, Zhou S, Yu J, Routledge I, et al. Changing epidemiology and challenges of malaria in China towards elimination. *Malar J* 2019 Mar;18(107):1–11.
159. Gunathilaka N, Hapugoda M, Wickremasinghe R, Abeyewickreme W. A Comprehensive Analysis on Abundance , Distribution , and Bionomics of Potential Malaria Vectors in Mannar District of Sri Lanka. *Malar Res Treat* 2019 Mar;1-13.
160. Silal SP, Little F, Barnes KI, White LJ. Predicting the impact of border control on malaria transmission: a simulated focal screen and treat campaign. *Malar J* 2015 Jul;14(1):1–14.
161. Qian Z, Junling S, Zike Z, Qibin G, Shengje L, Wenbiao H, et al. Risk assessment of malaria in land border regions of China in the context of malaria elimination. *Malar J* 2016 Nov; 15(1):1–9.
162. Baliga BS, Jain A, Koduvattat N, Kumar BGP, Kumar M, Kumar A, et al. Indigenously developed digital handheld Android-based Geographic Information System (GIS)-tagged tablets (TABs) in malaria elimination programme in Mangaluru city, Karnataka, India. *Malar J* 2019 Dec;18(444):1–11.
163. Gueye CS, Teng A, Kinyua K, Wafula F, Gosling R, Mccoy D. Parasites and vectors carry no passport: how to fund cross-border and regional efforts to achieve malaria elimination. *Malar J* 2012 Oct;11(344):1–10.
164. Chirombo J, Ceccato P, Lowe R, Terlouw DJ, Thomson MC, Gumbo A, et al. Childhood malaria case incidence in Malawi between 2004 and 2017: Spatio-temporal modelling of climate and non-climate factors. *Malar J* 2020 Jan;19(1):1–13.
165. Balawanth R, Ba I, Qwabe B, Gast L, Maharaj R, Raman J, et al. Assessing Kwa - Zulu - Natal ' s progress towards malaria elimination and its readiness for sub - national verification. *Malar J* 2019 Apr;18(108):1–12.
166. Ruktanonchai NW, Bhavnani D, Sorichetta A, Bengtsson L, Carter KH, Córdoba RC, et al. Census - derived migration data as a tool for informing malaria elimination policy. *Malar J* 2016 May;15(273):1–13.
167. Kunene S, Phillips AA, Gosling RD, Kandula D, Novotny JM. A national policy for malaria elimination in Swaziland: a first for sub-Saharan Africa. *Malar J* 2011 Oct; 10(313):
168. Mitjà O, Paru R, Selve B, Betuela I, Siba P, De Lazzari E, et al. Malaria epidemiology in Lihir Island, Papua New Guinea. *Malar J* 2013 Mar;12(1):1–8.
169. Hiwat H, Hardjopawiro LS, Takken W, Villegas L. Novel strategies lead to pre-elimination of malaria in previously high-risk areas in Suriname, South America. *Malar J* 2012;11:1–12.

170. Dery DB, Asante KP, Zandoh C, Febir LG, Brown C, Adjei G, et al. Baseline malaria vector transmission dynamics in communities in Ahafo mining area in Ghana. *Malar J* 2015 Apr;14(1):1–8.
171. Douine M, Mosnier E, Le Hingrat Q, Charpentier C, Corlin F, Hureau L, et al. Illegal gold miners in French Guiana: A neglected population with poor health. *BMC Public Health* 2017 Jul;18(1):1–10.
172. Yan SD, Orkis J, Khan Sohail S, Wilson S, Davis TA, Storey JD. Digging for care-seeking behaviour among gold miners in the Guyana hinterland: a qualitative doer non-doer analysis of social and behavioural motivations for malaria testing and treatment. *Malar J* 2020 Jul;19(1):1–16.
173. Aragão T, Santil V. Somos migrantes: o uso das redes sociais na produção mediática alternativa sobre a migração venezuelana em Roraima. *Ver Pan-Amazônica de Comunicação* 2018 Abr;2(1):136–56.
174. Silva JM, Velásquez FR. La Amazonía en disputa: agencias políticas y organizaciones indígenas de la Amazonía venezolana frente al Arco Minero del Orinoco. *Polis Rev Latinoam* 2019 Apr;18(52):11-29.
175. Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacas-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop* 2004; 90:61-4.
176. Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondonia, western Brazilian Amazon? *Rev Soc Bras Med Trop* 2000 Oct;33(5):489-92.
177. Jaramillo-Ochoa R, Sippy R, Farrell DF, Cueva-Aponte C, Beltran-Ayala E, Gonzaga JL, et al. Effects of Political Instability in Venezuela on Malaria Resurgence at Ecuador-Peru Border, 2018. *Emerg Infect Dis.* 2019 Apr; 25 (4):834-6.
178. Pereira VA, Sánchez-Arcila JC, Vasconcelos MPA, Ferreira AR, Videira LS, Teva A, et al. Evaluating seroprevalence to circumsporozoite protein to estimate exposure to three species of *Plasmodium* in the Brazilian Amazon. *Infect Dis Poverty* 2018;7(1):46.
179. Chadee DD, Tilluckdharry CC, Maharaj P, Sinanan C. Reactivation of *Plasmodium malariae* infection in a Trinidadian man after neurosurgery. *N Engl J Med* 2000 Jun;342(25):1924.
180. Siala E, Khalfaoui M, Bouratbine A, Hamdi S, Hili K, Aoun K. Relapse of *Plasmodium malariae* malaria 20 years after living in an endemic area. *Presse Med* 2005 Mar;34(5):371–2.
181. Chadee DD, Beier JC, Doon R. Re-emergence of *Plasmodium malariae* in Trinidad, West Indies. *Ann Trop Med Parasitol* 1999 Jul;93(5):467–75.
182. Guimaraes LO, Bajay MM, Wunderlich G, Bueno MG, Rohe F, Catão-Dias JL, et al. The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. *Acta Trop* 2012 Oct;124(1):27–32.

183. Webster HK, Gingrich JB, Wongsrichanalai C, Tulyayon S, Suvarnamani A, Sookto P, et al. Circumsporozoite antibody as a serologic marker of *Plasmodium falciparum* transmission. *Am J Trop Med Hyg* 1992 Oct;47(4):489–97.
184. Del Giudice G, Engers HD, Tougne C, Biro SS, Weiss N, Verdini AS, et al. Antibodies to the repetitive epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in a rural Tanzanian community: a longitudinal study of 132 children. *Am J Trop Med Hyg* 1987 Mar;36(2):203–12.
185. Burkot TR, Graves PM, Wirtz RA, Brabin BJ, Battistutta D, Cattani JA, et al. Differential antibody responses to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* circumsporozoite proteins in a human population. *J Clin Microbiol* 1989 Jun;27(6):1346–51.
186. The level of anti-sporozoite antibodies in a highly endemic malaria area and its relationship with exposure to mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992 Oct;86(5):499–504.
187. Campo JJ, Whitman TJ, Freilich D, Burgess TH, Martin GJ, Doolan DL. Toward a surrogate marker of malaria exposure: modeling longitudinal antibody measurements under outbreak conditions. *PLoS One* 2011 Jul;6:e21826.
188. White MT, Karl S, Koepfli C, Longley RJ, Hofmann NE, Wampfler R, et al. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection dynamics : re - infections , recrudescences and relapses. *Malar J* 2018;17(170):1–15.
189. Nascimento TL, Vasconcelos SP, Peres Y, Oliveira MJS, Taminato M, De Souza KMJ. Prevalência de recaída por malária: revisão sistemática com metanálise Método. *Rev Latino-Am. Enfermagem* 2019; 27:e3111.
190. Simões LR, Alves Jr ER, Ribatski-Silva D, Gomes LT, Nery AF, Fontes CJF. Fatores associados às recidivas de malária causada por *Plasmodium vivax* no Município de Porto Velho, Rondônia, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2014 Jul;30(7):1–15. .
191. Esposito F, Lombardi S, Modiano D, Zavala F, Reeme J, Lamizana L, et al. Immunity to *Plasmodium* sporozoites: recent advances and applications to field research. *Parassitologia* 1986 Dec;28(2-3):101–5.
192. Tapchaisri P, Asavanich A, Limsuwan S, Tharavanij S, Harinasuta KT. Antibodies against malaria sporozoites in patients with acute uncomplicated malaria and patients with cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1985 Sep;34(5):831–6.
193. Folegatti PM, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MV, Drakeley CJ, Braga EM. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. *Malar J* 2017;16(107):1-15.
194. Cotter C, Sturrock HJ, Hsiang MS, Liu J, Phillips AA, Hwang J, et al. The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *Lancet* 2013 Sep;382(9895): 900-11.
195. Shankarkumar U, Devaraj JP, Ghosh K, Karnad D, Anand K, Mohanty D. HLA associations in *P. falciparum* malaria patients from Mumbai, western India. *Indian J Malariol* 2002 Dec;39(3-4):76–82.

196. Machado RLD, Póvoa MM. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax-like*) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000 Aug;94(4):377–81.
197. Cochrane AH, Nardin EH, De Arruda M, Maracic M, Clavuo P, Collins WE, et al. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of plasmodium vivax. *Am J Trop Med Hyg* 1990 Nov;43(5):446–51.
198. RAdiSG - Rede Amazônica de Informação Socioambiental Georeferenciada RAdiSG. 2007. Available from: <https://www.amazoniasocioambiental.org/pt-br/>.
199. Castellanos A, Chaparro-Narváez P, Morales-Plaza CD, Alzate A, Padilla J, Arévalo M, et al. Malaria in gold-mining areas in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016 Jan;111(1):59-66.
200. Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, et al. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014 Aug;109(5):525-33.
201. Chao X, Qing-kuan W, Jin L, Ting X, Kun Y, Chang-Lei Z, et al. Characteristics of imported malaria and species of *Plasmodium* involved in Shandong province, China (2012-2014). *Korean J Parasitol* 2016 Aug;54(4):407-14.
202. Sriwichai P, Karl S, Samung Y, Kiattibutr K, Sirichaisinthop J, Mueller I, et al. Imported *Plasmodium falciparum* and locally transmitted *Plasmodium vivax*: cross-border malaria transmission scenario in northwestern Thailand. *Malar J* 2017 Jun; 16:1-9.

ANEXOS

Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 2 – Consentimiento Informado Libre y esclarecido

Anexo 3 – Questionário do Projeto: Caracterização epidemiológica da malária autóctone e importada e no estado de Roraima

Anexo 4 artigo publicado na - *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, em 2020

Anexo 5 – artigo publicado na *Am. J. Trop. Med. Hyg.* em 2020

Anexo 6 – artigo publicado na *Malaria Journal* em 2019

Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: Caracterização epidemiológica da malária autóctone e importada no estado de Roraima

Coordenadores: Jaime Louzada - Universidade Federal de Roraima (UFRR) e Joseli de Oliveira Ferreira - Laboratório de Imunoparasitologia IOC/Fiocruz.

Eu, Jaime Louzada e Joseli de Oliveira Ferreira, responsáveis pelo projeto de pesquisa intitulado “Caracterização epidemiológica da malária autóctone e importada no estado de Roraima”, estamos fazendo um convite para você participar como voluntário deste nosso estudo. Esta pesquisa tem o objetivo de obter mais conhecimento sobre a malária, doença transmitida por mosquito e que causa momentos de febre alta e calafrios após os quais a pessoa fica cansada e sem forças para trabalhar. A malária está fazendo muitas pessoas doentes em sua comunidade e queremos achar modos para impedir que isto aconteça. Além de verificar se você tem malária ou teve contato com o parasito da malária, vai saber qual a espécie de parasito que causa esta doença e se este parasito pode vir a ficar resistente ao tratamento.

Para a realização do projeto será feito o seguinte procedimento: Um volume de 10ml de sangue será coletado através da punção da veia do braço com a agulha descartável e tubo tipo vacutainer (de vidro). A retirada do sangue pode ser feita por médico, enfermeiro, farmacêutico ou um dos pesquisadores que trabalhe na pesquisa. O sangue servirá para o diagnóstico microscópico, molecular e sorológico da malária.

Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (rouidão) no local da punção que desaparece em 3 a 4 dias. Todos os cuidados devidos serão tomados, como uso de agulhas, tubos para coleta e gaze descartável, assim como álcool para assepsia(limpeza) local e curativo.

Com a exceção do diagnóstico da malária, não haverá nenhum benefício direto, mas é provável que sua participação nos ajude a descobrir mais sobre como prevenir e tratar malária em sua comunidade.

Os dados e todas as informações dadas por você são sigilosas e estão submetidas às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e o acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelos pesquisadores envolvidos no projeto. Também informamos que você pode

desistir de participar deste estudo a qualquer momento, sem prejuízo para seu atendimento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos.

A sua participação será sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer despesa e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Os gastos necessários para a realização da pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. O material coletado para realização dos exames ficará sob a guarda da coordenadora do projeto pelo período de cinco anos até que todos os experimentos propostos no projeto sejam realizados e se necessário para repetição de testes para confirmação de dados. Caso precise de algum esclarecimento pode contatar a qualquer momento que julgar necessário a coordenadora do projeto Dra. Joseli de Oliveira Ferreira através do telefone nº 21-3865-8102, nesse endereço - Instituto Oswaldo Cruz /IOC /FIOCRUZ - Av. Brasil, 4365 - Tel: (21)2598-4220 Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil CEP: 21040-360. Também você pode entrar em contato com o pesquisador Jaime Louzada por meio do telefone (95) 9819-0101 e no endereço – Rua do sanhaço 281 - Mecejana - Boa Vista. Ou ainda no **Curso de Bacharelado em Enfermagem** --Av. Capitão Ene Garcez, nº 2413, Bairro Aeroporto, CEP : 69310-000 Boa Vista/RR **bloco VI UFRR** Campus Paricarana - Centro de Ciências da Saúde Telefone: (95) 3224-3223. Ou no Endereço do CEP/UFRR: Bloco da PRPPG-UFRR, última sala do corredor em forma de T à esquerda (o prédio da PRPPG fica localizado atrás da Reitoria e ao lado da Diretoria de Administração e Recursos Humanos - DARH)Av. Cap. Ene Garcez, 2413 – Aeroporto (Campus do Paricarana)CEP: 69.310-000 - Boa Vista – RRE-mail: coep@ufr.br(95) 3621-3112 Ramal 26

O pesquisador responsável me colocou a par de todas as informações referentes a este estudo estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa. Atesto que assinei duas vias do termo de consentimento de igual teor e fiquei com uma via.

_____ Data: _____

Nome do voluntário

_____ Data: _____

Nome do Pesquisador

_____ Data: _____

_____ Data: _____

Testemunha 1

Anexo 2 - Consentimiento Informado Libre y esclarecido

Consentimiento Informado Libre y esclarecido

Proyecto de Investigación: Caracterización epidemiológica de malaria autóctona e importada en el Estado de Roraima

Coordinadores: Jaime Louzada – Universidad Federal de Roraima e Joseli de Oliveira Ferreira – Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Nosotros, JAIME LOUZADA y JOSELI DE OLIVEIRA FERREIRA, responsables del proyecto de **investigación titulado** “Caracterización epidemiológica de malaria autóctona e importada en el Estado de Roraima”, estamos haciendo una invitación para que usted participe como voluntario de nuestro estudio. Esta investigación tiene como objetivo el obtener un mejor conocimiento sobre la malaria en el Estado de Roraima. Además de verificar si usted tiene malaria, va a saber que parásitos causan esta enfermedad en la región y si usted posee anticuerpos defensas para el parásito que causa malaria. El conocimiento que obtengamos de sus respuestas será importante para el control de la enfermedad y para que no se expanda. La malaria es una enfermedad transmitida por mosquitos que puede causar fiebre alta y escalofríos por lo que la persona se siente cansada y sin fuerzas para trabajar.

Para la realización del proyecto es necesario realizar una colecta de sangre para diagnosticar malaria. **La colecta de sangre se hará de la vena del brazo** no del dedo. La colecta de sangre se hará tomando 10ml de sangre del brazo con una aguja descartable y con un tubo tipo vacutainer, pudiendo en algún momento de la investigación ser solicitado para una nueva colecta de sangre (siempre y cuando usted esté de acuerdo). La sangre será retirada por un médico, enfermero ó farmacéutico ó por uno de los dos investigadores que trabajan en esta investigación.

Toda la información sobre cada paso de la colecta será dada por el profesional de salud (enfermero, investigador o persona responsable) y cualquier problema deberá ser comunicado al personal responsable de verificar las necesidades de los locales de atención.

Los datos y todas las informaciones dadas por usted están reguladas (bajo protección) por normas éticas destinadas a investigación que involucran seres humanos. El resultado de este estudio podrá ser publicado sin revelar sus identidades y el acceso y análisis de los datos colectado será hecho por los investigadores involucrados en el proyecto. También le informamos que usted puede desistir de participar del estudio en cualquier momento, sin perjuicio de seguimiento ó de sufrir algún tipo de sanción.

Su participación será voluntaria sin recibir ningún tipo de incentivo financiero ó recompensa y con la finalidad exclusiva de colaborar con la investigación. En caso precise de

alguna aclaración sírvase contactar al coordinador del proyecto Jaime Louzada por teléfonoal n° (95) 8119-0101 ó (95) 3623-4446 ó podrá contactar al Comité de Ética e Investigación de la Universidad Federal de Roraima teléfono n° (95) 3621-3112.

Yo, _____ consiento (acepto) que los procedimientos descritos previamente sean realizados en mi persona. Certifico que firmé dos copias de consentimientos informados y que me quede con una copia.

Fecha: _____
Firma del voluntario

Fecha: _____
Firma del Investigador

Fecha: _____
Firma del Testigo

Anexo 3 – Questionário do Projeto: Caracterização epidemiológica da malária autóctone e importada e no estado de Roraima

QUESTIONÁRIO

Projeto: Caracterização epidemiológica da malária autóctone e importada e no estado de Roraima

REGISTRO Nº _____

Data: ____/____/____

DADOS PESSOAIS

NOME: _____						
SEXO: F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>			IDADE: _____			
DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____			NATURALIDADE: _____			
ENDEREÇO DE _____		RESIDÊNCIA: _____				
CIDADE: _____		PAÍS: _____		TEMPO DE RESIDÊNCIA (ANOS): _____		
ESCOLARIDADE: _____			PROFISSÃO: _____		ONDE ESTEVE / ATIVIDADE (15 DIAS) _____	
LOCALIDADES	ONDE	ESTEVE	NOS	ÚLTIMOS	ANOS	(ENDEREÇO)
1. _____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____ ZONA	RURAL	<input type="checkbox"/>	_____	ZONA	URBANA	<input type="checkbox"/> GARIMPO
2. _____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____ ZONA	RURAL	<input type="checkbox"/>	_____	ZONA	URBANA	<input type="checkbox"/> GARIMPO
3. _____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____ ZONA	RURAL	<input type="checkbox"/>	_____	ZONA	URBANA	<input type="checkbox"/> GARIMPO

HISTÓRIA PREGRESSA DE MALÁRIA

NÚMERO DE INFECCÕES ANTERIORES DE MALÁRIA: <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> ≤5 <input type="checkbox"/> >5
ESPÉCIES: <input type="checkbox"/> P. FALCIPARUM <input type="checkbox"/> P. VIVAX <input type="checkbox"/> P. MALARIAE <input type="checkbox"/> NÃO LEMBRA
DATA DA ÚLTIMA INFECCÃO: ____/____/____ MESES TRANSCORRIDOS: _____
ESPÉCIES: <input type="checkbox"/> P. FALCIPARUM <input type="checkbox"/> P. VIVAX <input type="checkbox"/> P. MALARIAE <input type="checkbox"/> NENHUMA <input type="checkbox"/> NÃO LEMBRA
LOCAL PROVAVEL DE INFECCÃO: _____
RECEBEU TRATAMENTO PARA MALÁRIA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO ONDE: _____
JA FOI HOSPITALIZADO COM MALÁRIA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
ONDE: _____ DATA: ____/____/____

EXPOSIÇÃO A MALÁRIA

LOCALIZAÇÃO DA RESIDENCIA/TRABALHO:
<input type="checkbox"/> FLORESTA <input type="checkbox"/> LAVRADO <input type="checkbox"/> COLEÇÃO D'ÁGUA <input type="checkbox"/> SITIO <input type="checkbox"/> GARIMPO <input type="checkbox"/> CIDADE
USO MEDIDAS DE CONTROLE : MOSQUITEIRO: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO REPELENTES: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
BORRIFAÇÃO INSETICIDA: DOMICILIO: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO ESPACIAL: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
CHA/REMÉDIOS: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO QUAL? _____

INFECCÃO ATUAL MALÁRIA

SINTOMAS <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO DATA INICIO SINTOMAS: ____/____/____
<input type="checkbox"/> FEBRE <input type="checkbox"/> CEFALÉIA <input type="checkbox"/> CALAFRIOS <input type="checkbox"/> NÁUSEA <input type="checkbox"/> MIALGIA <input type="checkbox"/> DIARREIA <input type="checkbox"/> OUTROS
TOMOU REMÉDIO PARA MALÁRIA (ÚLTIMOS 15 DIAS) : <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
QUAL REMÉDIO?: _____

DIAGNÓSTICO

PARASITOLÓGICO: NEG F F+Fg V F+V V+Fg Fg M F+M V+M

Parasitemia: Formas: _____ +/2 + ++ +++ ++++

COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO (QUANTIDADE)

GOTA ESPESSA: _____ PAPEL FILTRO: _____ PLASMA: _____ HEMÁCIAS: _____

OBS: _____

INFORMAÇÃO ADICIONAL: _____

RESPONSÁVEL PELO PREENCHIMENTO DA FICHA:

Anexo 4 artigo publicado na - *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, em 2020

The impact of imported malaria by gold miners in Roraima: characterizing the spatial dynamics of autochthonous and imported malaria in an urban region of Boa Vista

Jaime Louzada¹, Nathália Coelho Vargas de Almeida², Joao Luiz Pereira de Araujo³, Júlio Silva⁴, Thiago M Carvalho¹, Ananias A Escalante⁵, Joseli Oliveira-Ferreira^{6/t}

¹Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, RR, Brasil

²Secretaria de Saúde de Roraima, Coordenação Geral de Vigilância em Saúde, Boa Vista, RR, Brasil

³Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, Brasil

⁴Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁵Temple University, Institute for Genomics and Evolutionary Medicine, Department of Biology, Philadelphia, PA, United States of America

⁶Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunoparasitologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

BACKGROUND The number of malaria cases in Roraima nearly tripled from 2016 to 2018. The capital, Boa Vista, considered a low-risk area for malaria transmission, reported an increasing number of autochthonous and imported cases.

OBJECTIVES This study describes a spatial analysis on malaria cases in an urban region of Boa Vista, which sought to identify the autochthonous and imported cases and associated them with *Anopheles* habitats and the potential risk of local transmission.

METHODS In a cross-sectional study at the Polyclinic Cosme e Silva, 520 individuals were interviewed and diagnosed with malaria by microscopic examination. Using a global positional system, the locations of malaria cases by type and origin and the breeding sites of anopheline vectors were mapped and the risk of malaria transmission was evaluated by spatial point pattern analysis.

FINDINGS Malaria was detected in 57.5% of the individuals and there was a disproportionate number of imported cases (90.6%) linked to Brazilian coming from gold mining sites in Venezuela and Guyana.

MAIN CONCLUSIONS The increase in imported malaria cases circulating in the west region of Boa Vista, where there are positive breeding sites for the main vectors, may represent a potential condition for increased autochthonous malaria transmission in this space.

Key words: imported cases of malaria - spatial analysis - gold miners

Malaria continues to be a significant public health problem worldwide, causing about 228 million new cases, with approximately 405,000 deaths per year, especially in Africa.⁽¹⁾ Although the global incidence rate decreased by 18% between 2010 and 2016, there was a substantial increase between 2014 and 2015 in the Americas, primarily due to a surge of malaria cases in Brazil and Venezuela.⁽²⁾ In Brazil, the number of malaria cases increased from 143,748 in 2015 to 193,837 in 2018 after seven years of decline, and in Venezuela (Bolivarian Republic of Venezuela) increased from 91,918 in 2015 to 414,527 in 2017, mainly in the Bolivar State in the southeast of the country bordering with Guyana and the Brazilian State of Roraima.⁽³⁾ Also, the region has gold mining areas where working and living conditions are considered a problem for malaria control. Indeed, Bolivar State is a regional hot-spot from which malaria has spilled over to other neighboring countries overloading

health care services in border municipalities of Brazil and Colombia that receive imported cases of malaria, including *Plasmodium falciparum*.⁽⁴⁾

Roraima is the Brazilian State in the extreme north of the country that shares international borders with Guyana and Venezuela. In that space, human mobility across borders was usually intense but temporary. However, since 2017, Roraima has experienced the impact of an unprecedented unidirectional migration of Venezuelans due to the economic and political crisis in their country.⁽³⁾ According to UNICEF and migration authorities in Brazil, an estimate of 178,000 Venezuelans has crossed into Roraima, with at least 32,000 settlements in Boa Vista, the State capital, located approximately 100 km distant from Guyana and 200 km from Venezuela.⁽⁵⁾ Certainly, the increase in border population movements between Brazil, Venezuela, and Guyana have affected malaria control measures and contributed to the spread of the disease in Roraima State.⁽⁶⁾

Data from the Ministry of Health, SIVEP-Malaria (Epidemiologic Surveillance Information System — Malaria), show that the number of reported cases in Roraima nearly tripled from 8,969 cases in 2016 to 23,369 in 2018.⁽⁷⁾ Malaria is endemic in many municipalities which have various degree of endemicity. However, 39% of the cases were imported from other states in Brazil (3,625 cases) and other countries (5,513), mainly from Venezue-

doi: 10.1590/0074-02760200043

Financial support: PAF (IOC-023-FIO-18-2-47 and CAPES - Finance Code 001. JOF is the recipient of a Research Productivity Fellowship from the CNPq.

+ Corresponding author: lila@ioc.fiocruz.br

● <https://orcid.org/0000-0002-6063-465X>

Received 27 January 2020

Accepted 16 June 2020



online | memorias.ioc.fiocruz.br

la (4,478 cases) and Guyana (610 cases).⁽¹⁰⁾ *P. falciparum* infections accounted for 26% of the imported and 9.8% of the autochthonous case.⁽⁷⁾

Boa Vista is the municipality reporting most of the malaria imported cases from neighboring countries. In 2010 the number of reported cases were 5,948 and only 6% were autochthonous.⁽⁷⁾ In 2011, the number of imported cases dropped to 4,354 and the autochthonous to 248 cases. This tendency to fall was maintained until reaching its lowest value in 2016, with about 2,357 imported cases and 12 autochthonous. However, in the years 2017 to 2018 there was a new increase in imported cases.⁽⁷⁾

In 2018, Boa Vista reported 5,713 cases, 168 (3%) autochthonous, 2,805 (49%) imported from other municipalities/states in Brazil, and 2,740 (48%) from other countries, mainly Venezuela (n = 2,115) and Guyana (n = 533). It is also noteworthy that, in 2018, cases of *P. falciparum* infection from Venezuela (n = 481) and Guyana (n = 97) represent 80% of the notifications of *P. falciparum* registered in Boa Vista (722 cases).⁽⁷⁾ Studies of malaria vectors in Roraima performed more than ten years ago found that *Anopheles albitarsis* and *An. darlingi* were infected with *Plasmodium* spp.^(8,9)

Despite being considered a low-risk area for malaria transmission, the consistent numbers of imported malaria cases, which are a possible source of infection, together with the presence of competent vectors in urban areas, make possible outbreaks and epidemics in Boa Vista.⁽¹⁰⁾ A sustained increase in local transmission would be a significant setback for malaria elimination efforts in Boa Vista.

Considering the multiple factors that may drive the increase in malaria observed in Brazil, disentangling their differential contribution will guide how to better deploy interventions. Therefore, this study aimed to understand the epidemiology of the imported malaria cases and the potential risk of increased transmission in an urban region of Boa Vista.

SUBJECTS AND METHODS

Study site - The study was carried out in Boa Vista, Roraima State, the only Brazilian State capital located entirely in the northern hemisphere, between Latitude 02°49'12" N and Longitude 60°40'23" W. Boa Vista occupies an area of 5,687,037 Km², concentrates 63.4% of the state's population and has a demographic density of 49.99 inhabitants per Km² (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2016). Savanna is the predominant ecological environment in Boa Vista and the climate presents two distinct seasons: a rainy season between April and November with high rainfall indices during the months of June and July and the dry season between December and March. The geographical position of the municipality allows easy access to international borders thus positioned: in the north part of the state in the municipality of Pacaraima, which borders Santa Elena do Uairén in Venezuela, 231.5 km from Boa Vista, a land route (BR- 174). The municipality of Bonfim bordering Lethem, Cooperative Republic of Guyana, 133.3 km from Boa Vista via BR-401. To the South, the State is bordered by Amazonas State and Pará, Fig. 1.

Study population and sample collection - Samples and research data were collected from March 2016 to September 2018 at the Polyclinic Cosme e Silva. It is a health unit of the Unified Health System (SUS) that has a high demand for various medical specialties. This Polyclinic is strategically located in the west area of the city of Boa Vista, which has a population of 152,062 inhabitants (IBGE - 2016), distributed in 33 (thirty-three) neighborhoods. According to data from Ministry of Health, SIVEP - Malaria, among the 13 health units that offer malaria diagnosis in Boa Vista, the Polyclinic was the one that registered the highest number of cases in the last 5 years, as follow: in 2011, 2,354 cases; in 2012, 1,424 cases; in 2013, 1,713 cases; in 2014, 1,384 cases; and 966 cases in 2015.⁽¹⁰⁾ Taking in account the total number of re-



Fig. 1: maps of Brazil and Roraima State in the border of Venezuela and Guyana. The studied site Boa Vista and the border municipalities of Pacaraima and Bonfim. Source: by the authors themselves.

ported cases in Boa Vista in the same period (2011-2015), the Polyclinic Cosme e Silva was responsible for 51%, 44%, 42%, 54% and 48.8% of the reported cases, respectively.⁽⁷⁾ Therefore, all individuals seeking a malaria diagnosis in the Public Health Unit Polyclinic Cosme e Silva, were eligible to participate in the study.

A questionnaire, completed by each participant, was used to collect demographic data, travel history, and epidemiological data. Blood was drawn from each participant by venipuncture and malaria infection was diagnosed by microscopic examination of Giemsa stained blood smears. The parasitological evaluations were performed by examination of 200 fields at 1,000-fold magnification under oil immersion. Parasite densities were estimated by counting the number of parasites per microliter of blood (all species and stages) per 200 leukocytes in thick blood films, multiplying this by the number of individual leukocytes, and dividing this by 200.

All positive individuals were treated with antimalarial drugs, according to the protocol of the Brazilian Ministry of Health. All the questionnaire data were stored in Epi Info™ 2002 (CDC, Atlanta, GA, USA). This protocol was approved by the Federal University of Roraima Ethical Committee (CAAE: 44055315.0.0000.5302).

Case definition - All malaria cases were classified as autochthonous or imported depending on the most likely place of acquisition as per the questionnaire. In this study, imported malaria was defined as malaria acquired outside the municipality of Boa Vista but diagnosed within the municipality. This was determined by the individual history of staying in an endemic municipality, state or country during the last one month. Autochthonous cases were defined as malaria acquired in the municipality of Boa Vista in persons without travel history outside the municipality in the last one month.

Breeding sites and larval collection - Twenty-three breeding sites were identified and georeferenced using Garmin GPS by technicians of the entomology service of the General Coordination of Health Surveillance of Roraima. The breeding sites were chosen based on the location of autochthonous cases in previous 3 years (2014 to 2016). These breeding sites have been monitored by the entomology service of the General Coordination of Health Surveillance every two months between 2017 and 2018 and only qualitatively classified as positive or negative for the presence of *Anopheles* spp larvae. The larvae collections were performed using standard entomological scoops (BioQuip, Ranch Dominguez, CA, USA). At each breeding site, nine scopes were made, three to the right, three to the front, and three to the left, following the Ministry of Health standard.⁽¹⁰⁾ Due to the great difficulty in rearing *Anopheles* larvae stage in the laboratory, *Anopheles* larvae from 1st and 2nd was used to determine if the breeding place were positive for *Anopheles* spp. Larvae (third and fourth-instar) and adults were identified using the keys of Consoli and Lourenço-de-Oliveira and Forattini.^(11,12) The larvae collected were transferred to plastic bags, labeled with the breeding site code, date and collector. All collected material was transferred to the state entomology labora-

tory to be screened and identified. The breeding site was considered positive if in at least one collection per year presented *Anopheles* spp larvae.

Spatial analysis - The spatial dynamics of malaria in Boa Vista were analysed considering three situations: mapping of individuals with malaria, positive breeding sites for *Anopheles* and circulation time between first symptoms and treatment initiation. To perform spatial analysis, the locations of disease occurrence was recorded based on the address of malaria patients (Street and Neighborhood) and geographic coordinates were obtained, in decimal degrees geographic coordinate system, via Google Maps geographic location service.

The data were processed in the QGIS 2.14.17 software, executed from the Windows platform, to generate maps.

The basic cartography set was georeferenced using the decimal degrees geographic coordinate system and the World Geodetic System-1984 reference system (WGS84). All geographic data were processed in the Landscape Metrics Laboratory of the Department of Geography of the Federal University of Roraima (UFRR), which has available satellite images and cartographic basis of Boa Vista for the preparation of thematic maps.

Statistical analysis and spatial point pattern analysis - Demographic, epidemiological and parasitological data were entered into a database created using the Epi Info software (Epi Info™, Atlanta, GA, USA). For statistical purpose, the following variables were taken into consideration: gender, age, residence, nationality, occupation, place of infection, symptoms, days since first symptoms and past and present malaria infections. Proportions were compared using 2x2 contingency tables with either chi-squared tests, adjusted by Yates' continuity correction or Fishers exact tests, as appropriate. Odds ratios (OR) analysis were used to quantify the strength of the association between variables. The statistical significance threshold was $p < 0.05$, with 95% confidence intervals (95% CI) for all hypothesis tests. These analyses were performed using GraphPad InStat, version 3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the hypothesis of risk for malaria transmission in the western region of Boa Vista due to the existence of breeding sites and individuals with imported malaria, part of which with gametocytes. This test was applied in order to assess whether the distribution of the points follows a homogeneous Poisson process or whether the points are distributed according to a clustering model. For the interpretation of the values, consider a 5% level of significance in the results (95% CI). In summary, the null hypothesis to be tested is that the distribution of points throughout the region under study follows a homogeneous Poisson process.^(13,14)

In order to verify the hypothesis of complete spatial randomness, the analysis of specific processes was carried out by evaluating the graph of the G, F, K and L functions, to verify whether the points are distributed randomly or in the form of grouping throughout the region under study. The G function represents the distance from the nearest event (breeding sites, malaria and ga-

metocytes cases), the plotted results of this function can be used as an exploratory method to check if there is evidence of interaction between the events; F function aims to check the risk rate, since it measures the distribution of all distances from an arbitrary point (cases, breeding sites and gametocytes) to the point closest to it; the K function represents the Ripley's function, that allows the detection of the spatial pattern at different distance scales simultaneously; while the L function consists of the Besag transformation function of the Ripley's function.⁽¹⁵⁾ In the horizontal axis of the graphs it is shown distances between the points (individuals with malaria, breeding sites and gametocytes), so that in the vertical axis we have the density values based on the estimators of the functions G, F, K and L, respectively. The black lines mean the observed values, while the red lines cor-

respond to the theoretical values of the function. The gray value range consists of the 95% CI, considering 99 simulations. The analyzes were performed using the software R v. 3.6.2.

RESULTS

Characteristic of the studied population - During the study period, 520 individuals participated in the study, 299 (57.5%) were positive for *Plasmodium* in the thick blood smear. The characteristics of the study population are presented in Table I. The majority of the individuals were male (74.6%), the mean age was 36 years and the nationality was predominantly Brazilians with permanent residence in Boa Vista, Roraima State. However, their main occupation was gold mining or mining activities in Venezuela and Guyana. Overall, 468 individuals de-

TABLE I
Characteristics of the study population according to malaria diagnosis in Boa Vista, Roraima State during 2016 to 2018

Variables	Malaria diagnosis			Odds ratios (95% CI)	p-value
	Positive 299	Negative 221	Total 520		
Gender n (%)					
Male	225 (75.2)	163 (73.7)	388 (74.6)	1.08 (0.73-1.61)	0.7
Female	74 (24.8)	58 (26.3)	132 (25.4)	1	-
Age n (%)					
< 28	92 (30.8)	41 (18.5)	133 (25.6)	1	-
28 - 35	83 (27.7)	60 (27.1)	143 (27.5)	0.62 (0.38-1.01)	0.06
36 - 44	70 (23.4)	53 (24.0)	123 (23.6)	0.59 (0.35-0.98)	0.04
> 44	54 (18.1)	67 (30.4)	121 (23.3)	0.36 (0.21-0.6)	< 0.01
Nationality n (%)					
Brazilian	282 (94.3)	215 (97.3)	497 (95.6)	1	-
Venezuelan	15 (5.0)	6 (2.7)	21 (4.0)	1.9 (0.72-4.98)	0.19
Guyanese	2 (0.7)	0 (0)	2 (0.4)	-	-
Occupation n (%)					
Gold mining	186 (62.2)	150 (67.9)	336 (64.6)	1	-
Other occupation	113 (37.8)	71 (32.1)	184 (35.4)	1.28 (0.89-1.85)	0.18
Residence n (%)					
Boa Vista	293 (98.0)	218 (98.7)	511 (98.2)	-	-
Other municipalities/state	6 (2.0)	3 (1.3)	9 (1.8)	1.49 (0.37-6.02)	0.58
Past ME n (%)					
> 5	222 (74.2)	165 (74.7)	387 (74.4)	1	-
≥ 5	40 (13.4)	41 (18.6)	81 (15.6)	0.8 (0.5-1.29)	0.37
Never had	37 (12.4)	15 (6.7)	52 (10.0)	1.72 (0.87-3.39)	0.12
ME last 3 years median (IQR)	0 (0.1)	1 (0.1)	1 (0.1)	1.1 (0.88-1.38)	0.41
Days since last ME median (IQR)	60 (30.180)	60 (30.180)	60 (30.180)	1 (1.1)	0.76
Symptoms n(%)					
Yes	286 (95.6)	215 (97.2)	501 (96.3)	1.36 (0.43-4.28)	0.6
No	13 (4.4)	6 (2.8)	19 (3.7)	1	-

m ± sd: mean ± standard deviation; ME: malaria episodes. Odds ratios analysis were used to quantify the strength of the association between variables. P value < 0.05 were significative. IQR: interquartile range.

clared a history of malaria episodes (90%); the majority reported more than five episodes (74.4%) and 10% did not recall past infection in their lifetime. Ninety-six percent of the asymptomatic individuals (n = 19), 68.4% had a positive diagnosis for malaria while 31.6% were negative. No difference was observed in the nationality, place of residence, occupation, and number of malaria episodes in the last three years between positive and negative individuals. However, proportion of malaria positives individuals decreases in the age groups 36-44 (OR = 0.59, 95% CI 0.35 - 0.98; p = 0.04) and > 44 (OR = 0.36, 95% CI 0.21 - 0.6; p < 0.01), as compared to groups of younger ages.

Breeding sites - Boa Vista is located in an area with large rivers, streams and lakes, characteristics that favors the existence of breeding sites, in addition to the climate favorable to the presence of the main malaria vectors. The breeding sites were lakes, streams and natural permanent rivers, partially shaded and sunny with the pres-

ence of marginal vegetation, mainly in the dark and still waters. All 23 breeding sites mapped mostly murky and standing waters. All 23 were larval habitats for *Anopheles* spp larvae. *An. darlingi* and *An. albitarsis* were the species found in all investigated breeding sites, however, other species were as also found, *An. Nuneztovari* s.l., *An. Matogrossensis*, *An. Triannulatus* and *An. Evansae*.

Autochthonous and imported malaria cases - Of the 299 individuals positive for malaria infection during the studied period, 294 (98.3%) were imported and only five (1.7%) were autochthonous from the municipality of Boa Vista. Among these 172 were infected with *P. vivax*, 109 with *P. falciparum*, and 13 with mixed (*P. falciparum* + *P. vivax*). *P. vivax* was the most prevalent *Plasmodium* species found in 100% of the autochthonous cases and 57.5% of the imported cases. The observed *P. falciparum* and mixed (*P. falciparum* + *P. vivax*) infections were imported, Table II.

TABLE II

Characteristics of imported and autochthonous malaria infection diagnosed in Boa Vista, Roraima State during 2016 to 2018

Variables	Autochthonous	Imported	Total
Malaria infection n (%)	5 (1.7)	294 (98.3)	299 (57.5)
Age n(%)			
< 28	3 (60)	89 (30.3)	92 (30.8)
> 44	0 (0)	54 (18.4)	54 (18.1)
28-35	1 (20)	82 (27.9)	83 (27.8)
36-44	1 (20)	69 (23.5)	70 (23.4)
Gender, Male n (%)	4 (80)	221 (75.2)	225 (75.3)
<i>Plasmodium</i> species n (%)			
<i>P. falciparum</i>	0 (0)	109 (37.1)	109 (36.5)
<i>P. vivax</i>	5 (100)	172 (58.5)	177 (59.2)
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	0 (0)	13 (4.4)	13 (4.3)
Nationality n (%)			
Brazilian	5 (100)	278 (94.6)	283 (94.6)
Guyanese	0 (0)	1 (0.3)	1 (0.3)
Venezuelan	0 (0)	15 (5.1)	15 (5)
Place of infection n (%)			
Boa Vista	5 (100)	0 (0)	5 (1.7)
Guyana	0 (0)	95 (32.3)	95 (31.8)
Other countries	0 (0)	3 (1)	3 (1)
Other municipalities/states	0 (0)	23 (7.8)	23 (7.7)
Venezuela	0 (0)	173 (58.8)	173 (57.9)
Parasitemia median (IQR)			
<i>P. falciparum</i>	-	503 (280,900)	503 (280,900)
<i>P. vivax</i>	800 (463,1200)	462 (287.2,900.8)	468 (298,903)
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	-	534 (410,761)	534 (410,761)
Days since first symptoms median (IQR)	6 (6,13)	4 (3,6)	4 (3,6)

m ± sd: means ± standard deviation; days since first symptoms: time interval between first symptoms and diagnosis and treatment. IQR: interquartile range.

Brazilian were the majority of the cases (94.6%) followed by Venezuelan (5.1%) and Guyanese (0.3%). A large number of the imported cases were acquired in Venezuela (58.8%) and Guyana (32.3%). The cases from French Guyana and Suriname corresponded to 1% and 7.7% came from other municipalities of Roraima or other states in Brazil. Individuals with *P. falciparum* had, on average, a greater parasitemia than individuals affected by *P. vivax* and mixed infections. On average patients infected with *P. falciparum* and/or mixed infections sought diagnosis after about five days of onset of symptoms.

Spatial distribution of infecting malaria species and vectors - The available addresses of 271 imported and five autochthonous cases were used to plot the spatial distribution of the cases by species, Fig. 2. Only two out of five autochthonous *P. vivax* cases reported their residence; the other three reported the place of infection as the neighborhood where they work. All individuals reported not leaving the municipality in the last 1 month.

A radius of 1 km was established from the identified breeding sites as the mosquito's flight coverage area (green region of the map).^(16,17) An area at risk of malaria transmission was delimited on the map (pink region of the map) considering the location of autochthonous and imported cases and their spatial relations with the breeding sites. In Fig. 2, the majority plotted points were of *P. vivax* malaria (151 imported and five autochthonous), *P. falciparum* malaria corresponds to 88 georeferenced points, while 32 points on the map represent mixed malaria. The map includes the 23 georeferenced breeding sites in the city. We observed that the majority of cases were concentrated in the west of the city. Several breeding sites were also observed in the east side of the city (green area in Fig. 2).

Spatial distribution of gametocytes carriers and breeding sites - The residence of individuals positive

for gametocyte forms of *P. falciparum* and *P. vivax* and their relationship with breeding sites was plotted, Fig. 3. We observed that gametocyte positive individuals were found within the radius of action of the *Anopheles* established at 1 km (green area) from the larval collection points in the streams and rivers positive for both *An. darlingi* and *An. albicans*. The highest concentration of these individuals was in the south and west of the municipality. The latter has the largest number of neighborhoods, 33, and it is the most populous with 152,062 inhabitants. Most of these neighborhoods are in the city outskirts and are within the breeding places range (pink color on the map of Fig. 3). Noteworthy, 73% of the gametocyte's carriers sought treatment 48 h after the symptoms had started and these individuals were living in areas at risk of malaria transmission (pink color on the map) in several districts of Boa Vista, including the most populous zone of the municipality.

Risk of local malaria transmission - According to the test results [Kolmogorov-Smirnov = 0.2376 (p-value < 0.001 in 95% CI)], there are specific locations that tend to have a higher frequency of malaria cases. It is to say that the circulation of individuals with malaria along the west zone of the municipality of Boa Vista increases the risk of malaria transmission.

Results in Fig. 4 (G function) show that the observed values, that is, the distance between the cases of malaria and individuals carrying gametocytes from breeding sites (black line), are outside and above the confidence interval given by the gray area. Therefore, the circulation of individuals with the disease close to breeding sites is a risk factor for local malaria transmission. Analysis in a wider area, Fig. 4 (function F), the observed values, that is, the risk rate (black line), are outside and below the confidence interval given by the gray area. Thus, by the behavior of the function graph, the presence of individuals with malaria in this part of the municipality poses risk of local

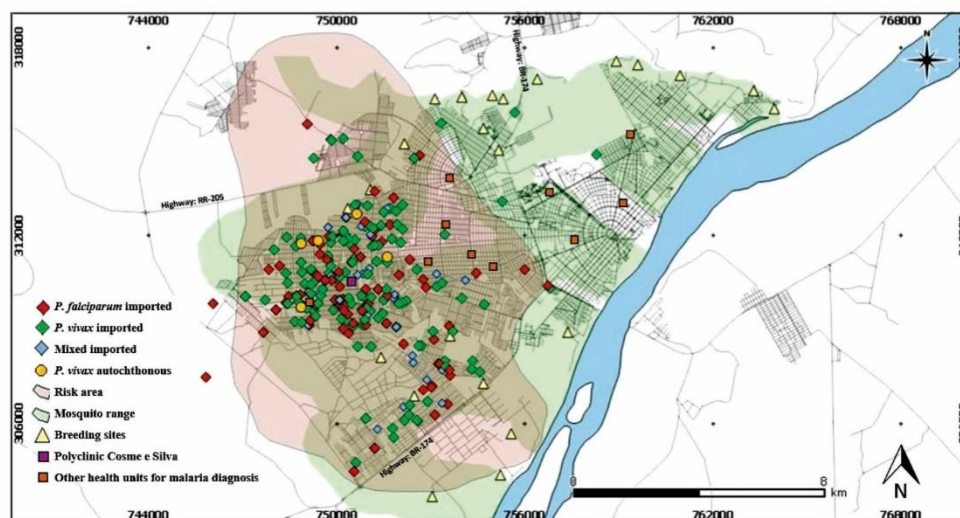


Fig. 2: distribution of malaria cases by species, origin and breeding sites positive for *Anopheles* spp immature forms in urban environment of Boa Vista.

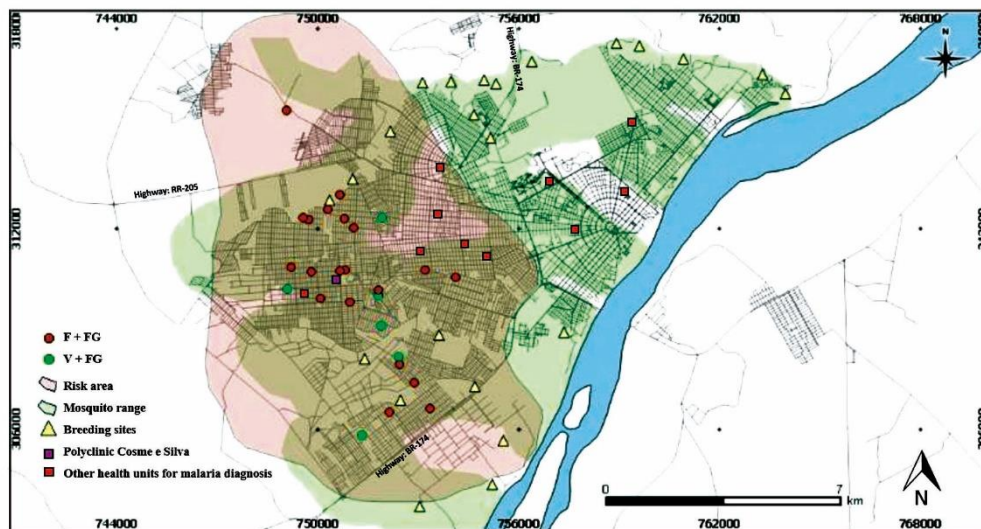


Fig. 3: distribution of gametocytes and vectors in the urban environment of Boa Vista. F+FG: individuals with thick blood smear positive for *Plasmodium falciparum* blood stages including *P. falciparum* gametocytes; V+FG: individuals with positive thick blood smear for *P. vivax* blood stages including *P. vivax* gametocytes.

malaria transmission. Indeed, in Fig. 4. The reduced second order measures (K and L functions), endorse risk of local malaria transmission indicated in function G and K. Therefore, the spatial distribution and proximity of malaria cases, individuals carrying gametocytes and malaria vector breeding sites favors local malaria transmission.

DISCUSSION

Roraima State has suffered an increase in the number of malaria cases. Its capital, Boa Vista, is the municipality with the highest number of imported cases in the State.⁽³⁾ Imported malaria is considered a critical impediment to elimination in many countries including Brazil. Indeed, this study shows that most of the cases reported in the Health Unit in the urban area of Boa Vista, during the time of this study, were imported from Venezuela (58.8%) and Guyana (32.3%) with only few autochthonous cases (1.7%), as previously observed.⁽⁷⁾ Autochthonous infections were all *P. vivax* while imported infections were attributed mainly to *P. vivax* and to a lesser extent to *P. falciparum*. Despite its relatively low number, *falciparum/vivax* mixed infections were detected in the study's site. Moreover, the vast majority of these imported cases (90.4%) were Brazilians coming from gold mining sites (90.4%) in Venezuela and Guyana rather than migrants from these countries. Overall, gold miners are at higher risk of contracting malaria making them a "hot pop" or subpopulation at higher risk of *Plasmodium* infection.⁽¹⁸⁾

Brazilian miners spend part of their time between the gold mines abroad and Boa Vista, where they live (98.3%) and sell the products of this labor, generating high mobility between endemic areas in Venezuela and Guyana to Boa Vista. Indeed, the massive flow of miners in this health unit reflects the high risk of malaria in the mining sites.^(7,19) Consistent with these observations, imported malaria in recent years has increased exponen-

tially as gold mining activities increase in 2018 and gold was the second most exported product in the state.^(19,20,21) There are currently 1,097 illegal mining points located in Venezuela, Guyana and Brazil (Yanomami indigenous lands) producing high mobility of job seekers.⁽²²⁾ Although these mining regions are generally unhealthy and dangerous, it provides an economic incentive that motivates the return of these individuals in search of survival, while still at risk of malaria. Overall, the situation observed in Roraima is consistent with reports emerging from other endemic areas in the Americas.^(23,24)

Results from our study indicate that there are several positive breeding sites for *An. darlingi* and *An. albicans* in Boa Vista. Also, we found asymptomatic individuals (4.3%) and the "time to start treatment of patients after the date of first symptoms" was over 48 h for 60% of patients. These factors could increase the risk of local transmission after malaria has been introduced. This situation requires increasing surveillance as evidenced by an increase of 1.300% in autochthonous cases in Boa Vista in 2018.

Importantly, the Boa Vista health services attract migrants from other municipalities and border cities seeking malaria treatment and the location of the city favors the movement of people and goods. These characteristics create a continuous flow between the mining areas and Boa Vista. The relationship between people's mobility and imported malaria has been pointed out in several studies as a concern for malaria control and elimination. In this case, mobility is linked to gold miners.

The risk of local malaria transmission observed by the spatial point pattern analysis, even if it is limited to an area of Boa Vista, deserves attention from health surveillance agencies, as it is a populous area where most neighborhoods are concentrated, in addition to housing farms and water collection. It is possible that this risk may extend to other areas of the city given the similarity of the

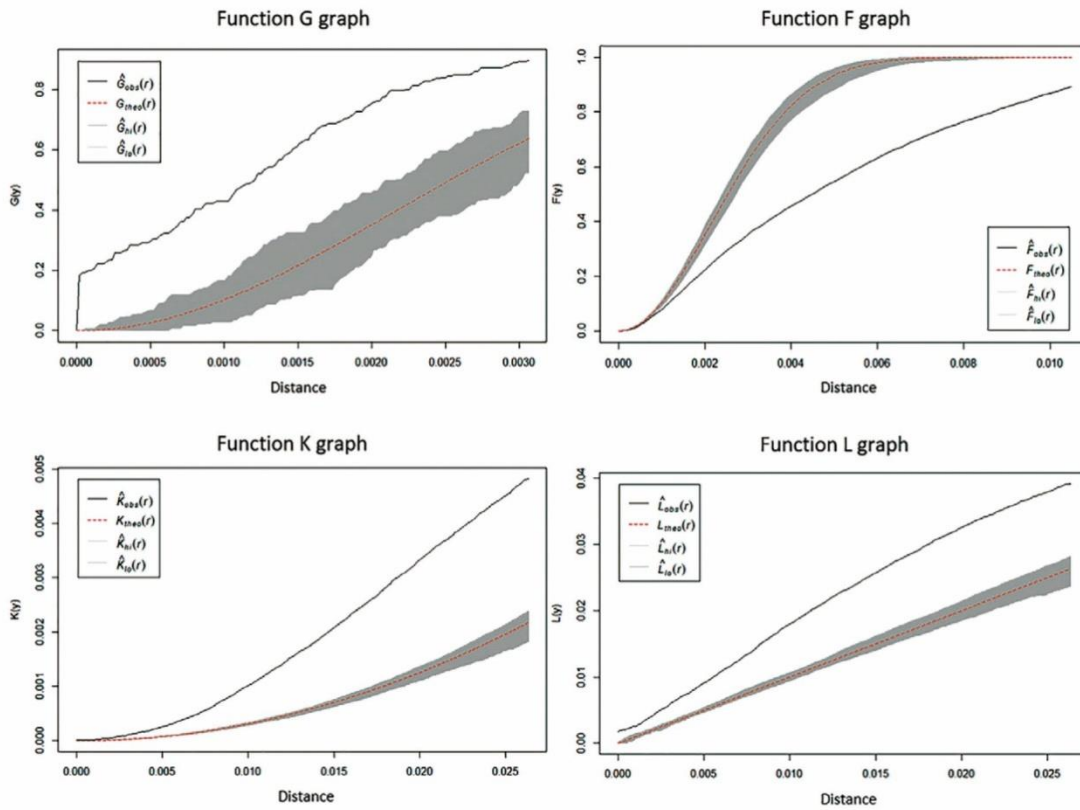


Fig. 4: analysis of the specific process functions G, F, K, L. Function: G (Distance function from the nearest event); Function: F (Risk rate function); Function: K (Ripley function); Function: L (Besag transformation function of Ripley function). Horizontal axis of the graphs: distances between the points (individuals with malaria, breeding sites and gametocytes); vertical axis: density values based on the estimators of the functions G, F, K and L, respectively. Black lines: observed values; red lines: theoretical values of the function; gray value range: 95% confidence interval, considering 99 simulations.

characteristics observed in the urban and peri-urban perimeter of the municipality. Therefore, the expansion of this study to other areas of the city is important in order to assess this risk for the city of Boa Vista as a whole.

In Boa Vista, during the study period, the main malaria control measures were passive case detection and treatment and other measures follow a specific demand focused on the occurrence of autochthonous cases. Active case detection of infected individual's, insecticide spraying of households and health education are limited to the probable place of infection of confirmed autochthonous case and neighborhood. Occasionally, identification of breeding sites and *Anopheles* larvae collection are performed. Therefore, implementation of control measures to reduce the risk of autochthonous transmission such as continuous surveillance of active case detection, monitoring *Anopheles* breeding sites associated with insecticide spraying of households and health education targeting the hot pop, especially gold miners should be strongly considered in Boa Vista.^(25,26)

It is worth noting that we did not observe any autochthonous *P. falciparum* infections, although our number was low (n = 5). However, data from the Ministry of

Health, SIVEP-Malaria have indicated 14 *P. falciparum* imported cases in Boa Vista in the last three years.⁽⁷⁾ Imported *P. falciparum* cases present an unusual distribution in other studies, affecting about two out of five individuals examined, a cause for concern as there is a risk of introducing and spreading *P. falciparum* resistant strains from neighboring countries in Brazil.^(27,28) In a macro-policy scenario, advocated by the Ministry of Health, through the elimination plan, Brazil aims to eliminate *falciparum* malaria by 2022.⁽²⁸⁾

There is no bilateral cooperation between Brazil and Venezuela such as that between Andean countries (Venezuela, Peru, Colombia, and Ecuador) for malaria containment.⁽²⁸⁾ However, since Brazilians miners are the ones introducing malaria, this may reveal weaknesses in border control measures, and poses a challenge for malaria control and, particularly, for *P. falciparum* elimination goals. Given the relatively good communication between Bolivar State and Roraima, and the gold mining activities in Bolivar State, the Brazilian-Venezuelan border could be regarded as a malaria corridor where the disease will likely remain resilient to uncoordinated control efforts across international borders.⁽²⁹⁾

The data reported in this research are important, however limited, as they represent only a certain area of the city of Boa Vista. In this study, participation of Brazilians with malaria was significantly higher than Venezuelans, with the majority of imported malaria coming from the mining region. As this study was limited to just one health unit, it is possible that other health centers provided assistance to Venezuelans with malaria.

Despite this limitation, it is important to note that in regions with low malaria transmission, the distribution of autochthonous cases has become more and more irregular and heterogeneous, capable of modifying local epidemiology, as observed by the increase of autochthonous cases in Boa Vista (1.300%).

In conclusion - Imported malaria in an urban area of Boa Vista is driven by Brazilians working on gold mines traveling across international borders. It seems that the origin of imported malaria in the west region of Boa Vista is related to mining and not to the migratory movement. Regardless of the motivation, malaria represents the universe of individuals at social risk. Despite the low number of autochthonous cases, the influx of imported infected travelers into areas with suitable vectors breeding sites, there is a potential risk for an increase in autochthonous malaria in the studied area, including the risk of introducing *P. falciparum* malaria. Therefore, early detection of malaria cases is necessary to limit their potential negative impact in achieving the goals of elimination plan proposed by the Brazilian Ministry of Health.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Rispah Abdhallah, Naomi W Lucchi, and Venkatachalam Udhayakumar, CDC. We thank Pedro Rufino da Silva, Valdenor Alves Macedo and Cleomar Oliveira da Silva for assistance with the breeding places mapping and Secretary of Health of Roraima — General Coordination for Health Surveillance for fieldwork support.

AUTHORS' CONTRIBUTION

JOF, JL and AAE conceived the idea and participated in the study design; JL, NCVA and JLP were responsible for sample collection; JOF, JL, NCVA, JLP, TMC, JC carried out the experiments and analysed the data; JOF, JL and TMC drafted the manuscript and JOF and AAE revised. All authors read, corrected and approved the final manuscript. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

- WHO - World Health Organization. World Malaria Report 2019. Geneva: WHO; 2019. Available from: https://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/.
- Espinoza JL. Malaria resurgence in the Americas: an underestimated threat. *Pathogens*. 2019; 8(1): 11.
- Grillet ME, Hernandez-Villena JV, Llewellyn MS, Paniz-Mondolfi AE, Tami A, Vincenti-Gonzalez MF, et al. Venezuela's humanitarian crisis, resurgence of vector-borne diseases, and implications for spillover in the region. *Lancet Infect Dis*. 2019; 19(5): e149-e61.
- Daniels JP. Increasing malaria in Venezuela threatens regional progress. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18(3): 257.
- Unicef. Crise migratória venezuelana no Brasil. 2019. Available from: <https://www.unicef.org/brazil/crise-migratoria-venezuelana-no-brasil>.
- Wangdi K, Gatton ML, Kelly GC, Clements AC. Cross-border malaria: a major obstacle for malaria elimination. *Adv Parasitol*. 2015; 89: 79-107.
- MS - Ministério da Saúde. Notificação de casos. 2020. Available from: http://portalweb04.saude.gov.br/Sivep_malaria/.
- Póvoa MM, de Souza RTL, Lacerda RNL, Rosa ES, Galiza D, de Souza JR, et al. The importance of *Anopheles albiparvus* E and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(2): 163-8.
- Rosa-Freitas MG, Tsouris P, Peterson AT, Honorio NA, de Barros FSM, de Aguiar DB, et al. An ecoregional classification for the state of Roraima, Brazil. The importance of landscape in malaria biology. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102(3): 349-57.
- SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Padronização dos métodos utilizados em pesquisa larvária de *Anopheles* na rotina dos laboratórios de entomologia. Nota Técnica no. 012-CGPNCM/DIGES/SVS/MS. Registro Número: 25000. 2011.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994. 228 pp.
- Forattini OP. Culicidologia médica. Vol. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Edusp; 2002.
- Durbin J. Boundary-crossing probabilities for the Brownian motion and Poisson processes and techniques for computing the power of the Kolmogorov-Smirnov test. *J Appl Probab*. 1971; 8(3): 431-53.
- Câmara G, Carvalho MS, Cruz OG, Correia V. Análise espacial de áreas. In: Druck S, Carvalho MS, Câmara G, Monteiro AMV, editores. Análise espacial de dados geográficos. Planaltina: Embrapa; 2004.
- Lewis PAW. Some results on tests for Poisson processes. *Biometrika*. 1965; 52(1-2): 67-77.
- Guerra CA, Reiner Jr RC, Perkins TA, Lindsay SW, Midega JT, Brady OJ, et al. A global assembly of adult female mosquito mark-recapture data to inform the control of mosquito-borne pathogens. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 276.
- Charlwood JD, Alecrim WA. Capture-recapture studies with the South American malaria vector *Anopheles darlingi*. *Root. Ann Trop Med Parasitol*. 1989; 83(6): 569-76.
- Cotter C, Sturrock HJ, Hsiang MS, Liu J, Phillips AA, Hwang J, et al. The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *Lancet*. 2013; 382(9895): 900-11.
- Douine M, Mosnier E, Le Hingrat Q, Charpentier C, Corlin F, Hureau L, et al. Illegal gold miners in French Guiana: a neglected population with poor health. *BMC Public Health*. 2017; 18: 23.
- Fellet J. Roraima exporta 194 kg de ouro à Índia sem ter nenhuma mina operando legalmente. *BBC News Brasil*. São Paulo, 12 de junho de 2019.
- Douine M, Musset L, Corlin F, Pelleau S, Pasquier J, Mutricy L, et al. Prevalence of *Plasmodium* spp. in illegal gold miners in French Guiana in 2015: a hidden but critical malaria reservoir. *Malar J*. 2016; 15: 315.
- RADISG - Rede Amazônica de Informação Socioambiental Georeferenciada RADISG. Available from: <https://www.amazoniasocioambiental.org/pt-br/>.

23. Castellanos A, Chaparro-Narváez P, Morales-Plaza CD, Alzate A, Padilla J, Arévalo M, et al. Malaria in gold-mining areas in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 111(1): 59-66.
24. Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, et al. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(5): 525-33.
25. Xu C, Wei QK, Li J, Xiao T, Yin K, Zhao CL, et al. Characteristics of imported malaria and species of *Plasmodium* involved in Shandong province, China (2012-2014). *Korean J Parasitol*. 2016; 54(4): 407-14.
26. Sriwichai P, Karl S, Samung Y, Kiattibutr K, Sirichaisinthop J, Mueller I, et al. Imported *Plasmodium falciparum* and locally transmitted *Plasmodium vivax*: cross-border malaria transmission scenario in northwestern Thailand. *Malar J*. 2017; 16(1): 258.
27. Chenet SM, Akinyi Okoth S, Huber CS, Chandrabose J, Lucchi NW, Talundzic E, et al. Independent emergence of the *Plasmodium falciparum* Kelch propeller domain mutant allele C580Y in Guyana. *J Infect Dis*. 2016; 213(9): 1472-5.
28. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016; 15(1): 284.
29. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*. 2017; 16(1): 273.

Anexo 5 – artigo publicado na *Am. J. Trop. Med. Hyg.* em 2020

Molecular Surveillance for Polymorphisms Associated with Artemisinin-Based Combination Therapy Resistance in *Plasmodium falciparum* Isolates Collected in the State of Roraima, Brazil

Naomi W. Lucchi,^{1*} Rispah Abdallah,¹ Jaime Louzada,² Venkatachalam Udhayakumar,¹ and Joseli Oliveira-Ferreira^{2,3}

¹Malaria Branch and Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia; ²Federal University of Roraima, Roraima, Brazil; ³Institute Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio De Janeiro, Brazil

Abstract. Given that the C580Y polymorphism in the *Plasmodium falciparum* propeller domain of the *kelch 13* gene (*pfk13*) was documented in Guyana, monitoring for mutations associated with antimalarial resistance was undertaken in neighboring Roraima state in Brazil. Polymorphisms in the *pfmdr1* and *pfk13* genes were investigated in 275 *P. falciparum* samples. No *pfk13* mutations were observed. Triple mutants 184F, 1042D, and 1246Y were observed in 100% of the samples successfully sequenced for the *pfmdr1* gene, with 20.1% of these having an additional mutation at codon 1034C. Among them, 2.5% of samples harbored two copies of the *pfmdr1* gene. We found no evidence of the spread of C580Y parasites to Roraima state, Brazil. As previously observed, the 184F, 1042D, and 1246Y mutations in the *pfmdr1* gene appear to be fixed in this region. Continued molecular surveillance is essential to detect any potential migration or local emergence of artemisinin-resistant mutation.

The introduction of artemisinin-based combination therapies (ACTs) for the treatment of malaria began in the 2000s in Cambodia and extended to South American countries and Africa in the early 2000. The first report of artemisinin resistance, resulting in delayed parasite clearance posttreatment, was reported in 2008 in Cambodia.¹ Since then, artemisinin resistance has been detected in several countries in the Greater Mekong Subregion (GMS).^{2–5} Mutations in the *Plasmodium falciparum* *kelch 13* propeller domain (*pfk13*) have been identified as molecular markers of artemisinin resistance.⁶ Currently, nine single nucleotide polymorphisms in the *pfk13* gene are validated as molecular markers for artemisinin resistance: F446I, N458Y, M476I, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H, and C580Y.⁷

Historically, resistance to antimalarial drugs, including chloroquine and sulfadoxine–pyrimethamine, has evolved independently in South America and South East Asia and then spread globally (reviewed in ref. 8). Interestingly, a focus of independent emergence of *pfk13* C580Y mutation was reported in Guyana based on samples collected in 2010.⁹ A molecular monitoring study using samples collected from 2017 in different parts of Guyana confirmed the presence of this mutation (Musset et al., in press). Genome analysis of these samples confirmed evolution of C580Y allele in a single genetic background in parasites belonging to the Guyana region (L. Musset, personal communication). The presence of this mutation in Guyana has not been linked to phenotypic association with drug failure; however, a study from Suriname, bordering Guyana and Brazil, reported > 10% of patients with delayed parasite clearance in a therapeutic efficacy study (TES), although this TES found no *pfk13* mutations.¹⁰ Nevertheless, these findings highlight the importance of continued monitoring for antimalarial drug resistance using TES and molecular monitoring in this region.

In 2018, Roraima reported 23,369 cases of malaria which was a 62% increase compared with 2017. Data from the Brazilian Secretariat of Health Surveillance revealed that 50% of patients seen in the State of Roraima were from Venezuela and Guyana.

Given the high rates of migration of people from Venezuela and Guyana to Brazil, there is a concern that *pfk13* mutations from Guyana could spread to Brazil. Therefore, we conducted a molecular monitoring study to assess the prevalence of known molecular markers of ACT resistance in Roraima state.

This study was part of a larger study aimed at understanding the epidemiology and characterization of autochthonous and imported malaria in Roraima state and approved by the Federal University of Roraima Ethical Committee (CAAE: 44055315.0.0000.5302) and the CDC. The study was carried out in three municipalities in Roraima state: Boa Vista, Pacaraima, and Rorainópolis, Figure 1.

All individuals seeking a malaria diagnosis in the health posts within the study sites were eligible to participate in the study. Informed consent was obtained from all enrolled participants from whom venous blood samples were obtained. The blood was used to prepare Giemsa-stained microscopic slides for malaria diagnosis and dried blood spots (Whatman 903 Protein Saver Cards) for molecular studies. All patients who were positive by microscopy for malaria parasites were treated with artemether–lumefantrine, according to the Brazilian national therapeutic guidelines for malaria. The DNA was isolated using a QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) following the manufacturer's recommendations. Samples were tested for species identification using photo-induced electron transfer PCR (PET-PCR) assay as previously described,¹¹ and all *P. falciparum* samples were analyzed for polymorphisms in the *pfk13*⁹ propeller domain and the *pfmdr1* gene using the Sanger sequencing method as previously described.^{12,13} The purified PCR products were sequenced using the BigDye Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), version 3.1, and an Applied Biosystems 3130XL capillary sequencer (Foster City, CA). Sequence analysis was performed using Geneious 7.1.7 software (Biomatters, Auckland, New Zealand). *Pfmdr1* Copy number variation (CNV) was determined using TaqMan real-time PCR (Stratagene MX3005P; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) as previously described.⁹

A total of 751 specimens were collected between March 2016 and November 2017: In all, 354 (47.1%) were obtained from Pacaraima, 340 (45.3%) from Boa Vista, and 57 (7.6%) from Rorainópolis. Of these, 275 (36.6%) were *P. falciparum* positive (age range, 16–89 years), 96 (34.9%) from Boa Vista,

* Address correspondence to Naomi W. Lucchi, Malaria Branch and Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd. NE, Atlanta, GA 30329. E-mail: nlucchi@cdc.gov



FIGURE 1. Study sites used for samples collection.

178 (64.7%) from Pacaraima, and 1 (0.4%) from Rorainópolis. We did not observe any mutations (associated with artemisinin resistance or otherwise) in the *pfk13* gene in the 239 (86.9%) successfully sequenced isolates, Table 1. A total of 224 samples were successfully sequenced for *pfmdr1* gene; all the 224 samples had mutations at codons 184F, 1042D, and 1246Y. Of these, 45 (20.1%) also had mutation at codon 1034. No mutations were observed at *pfmdr1* codon 86. Of the 240 samples successfully investigated for *pfmdr1* CNV, 6 (2.5%), all from Pacaraima, were shown to have two copies, Table 1.

Differences in the proportions of quadruple and triple *pfmdr1* mutants in Boa Vista and Pacaraima were analyzed using chi-squared test for proportions. We observed a significantly higher proportion of quadruple *pfmdr1* mutants in Pacaraima than Boa Vista, $X^2(1, N = 223) = 28.1709, P < 0.05$, Figure 2.

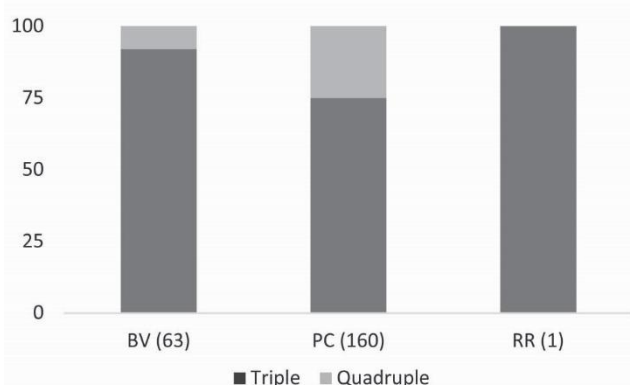
Results from our study show no evidence that *pfk13* polymorphisms, associated with resistance to artemisinin, have spread to Roraima state of Brazil. Our findings corroborate recent studies conducted in this region of Brazil, which

revealed no *pfk13* polymorphisms in the parasites investigated.¹⁴ In a recent study, none of the tested samples collected in the Brazilian Amazon basin before ACT introduction (1984–2006) and after ACT introduction (2006–2011) and between 2010 and 2017 were found to harbor any *pfk13* polymorphisms.¹⁴ A search for *pfk13* polymorphisms outside the GMS that included testing of 14,037 parasite samples collected in 59 malaria endemic countries, including Brazil, revealed no evidence for the existence of these polymorphisms in countries outside the GMS.¹⁵ Recent TES carried out in the Amazon basin in northern Brazil, the region that accounts for 99.8% of cases in the country, demonstrated adequate treatment outcomes using artemether–lumefantrine¹⁶ and artesunate–mefloquine.¹⁷ Neither studies identified any *pfk13* polymorphisms associated with artemisinin resistance, thus supporting the continued use of these ACTs for treatment of malaria in Brazil.

Monitoring all relevant partner drug resistance markers is equally important. In Brazil, artemether–lumefantrine is the first-line antimalarial treatment, commonly used in the Amazon region, and artesunate–mefloquine is used in the other regions. As previously observed, every successfully

TABLE 1
Observed polymorphisms in selected genes of *P. falciparum*

Gene/codons assayed	Number tested successfully	Mutations observed
<i>pfk13</i> Codons: F446I, N458Y, M476H, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H, and C580Y	239 (86.9%)	No mutations
<i>pfmdr1</i> Codons: 86, 184, 1034, 1042, and 1246	224 (81.5%)	86Y (0; 0.0%) 184F (224; 100%) 1034C (45; 20.1%) 1042D (224; 100.0%) 1246Y (224; 100.0%)
<i>pfmdr1</i> Copy number variation	240 (87.3%)	With two copies (6; 2.5%)



BV=Boa Vista; PC=Pacaraima; RR=Rorainópolis

FIGURE 2. Distribution of *Pfmdr1* triple and quadruple mutations in the study sites.

sequenced parasite harbored the 184F, 1042D, and 1246Y mutations in the *pfmdr1* gene, suggesting fixation of these resistance alleles. Some isolates had the additional 1034C polymorphism (20.1%). The presence of mutant *pfmdr1* alleles, especially the mutant 184F, that have been associated with tolerance to lumefantrine,¹⁸ suggests the vulnerability of partner drugs to resistance pressure in this region. The increase in the copy number of the *pfmdr1* gene is associated with mefloquine resistance. Several studies conducted in the Americas reported an absence or limited *pfmdr1* gene duplication in *P. falciparum*-isolated studies (reviewed in ref. 19). In keeping with these findings, we observed only six isolates (2.5%) with two copies of this gene. This contrasts with results obtained in South East Asia in which majority of *P. falciparum* isolates harbor more than one copy of the *pfmdr1* gene.

Overall, we found no evidence of *pfk13* C580Y, which supports the continued use of ACTs in this area. However, continued monitoring for potential emergence of resistance parasites is essential.

Received October 9, 2019. Accepted for publication November 4, 2019.

Published online December 12, 2019.

Acknowledgment: We would like to acknowledge the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Antimicrobial Resistance Working Group for funding support. J. O. F. is a recipient of a Research Productivity Fellowship from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and support from PAEF (IOC-023-FIO-18-2-47).

Disclaimer: The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent those of the Centers for Disease Control and Prevention.

Authors' addresses: Naomi W. Lucchi, Rispah Abdallah, and Venkatachalam Udhayakumar, Malaria Branch and Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, E-mails: nlucchi@cdc.gov, yei3@cdc.gov, and vxu0@cdc.gov. Jaime Louzada, Federal University of Roraima, Roraima, Brazil, E-mail: jaime.louzada@gmail.com. Joseli Oliveira-Ferreira, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio De Janeiro, Brazil, E-mail: lilafiocruz@gmail.com.

REFERENCES

- Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM; Artemisinin Resistance in Cambodia 1 Study C, 2008. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 359: 2619–2620.
- Dondorp AM et al., 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361: 455–467.
- Huang F, Tang L, Yang H, Zhou S, Liu H, Li J, Guo S, 2012. Molecular epidemiology of drug resistance markers of *Plasmodium falciparum* in Yunnan province, China. *Malar J* 11: 243.
- Kyaw MP et al., 2013. Reduced susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in southern Myanmar. *PLoS One* 8: e57689.
- Phyo AP et al., 2012. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* 379: 1960–1966.
- Ariey F et al., 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505: 50–55.
- World Health Organization, 2018. *Artemisinin Resistance and Artemisinin-Based Combination Therapy Efficacy*. Geneva, Switzerland: WHO.
- Conrad MD, Rosenthal PJ, 2019. Antimalarial drug resistance in Africa: the calm before the storm? *Lancet Infect Dis* 19: e338–e351.
- Chenet SM et al., 2016. Independent emergence of the *Plasmodium falciparum* kelch propeller domain mutant allele C580Y in Guyana. *J Infect Dis* 213: 1472–1475.
- Vreden SG, Bansie RD, Jitan JK, Adhin MR, 2016. Assessing parasite clearance during uncomplicated *Plasmodium falciparum* infection treated with artesunate monotherapy in Suriname. *Infect Drug Resist* 9: 261–267.
- Lucchi NW et al., 2014. PET-PCR method for the molecular detection of malaria parasites in a national malaria surveillance study in Haiti, 2011. *Malar J* 13: 462.
- Griffing S, Syphard L, Sridaran S, McCollum AM, Mixson-Hayden T, Vinayak S, Villegas L, Barnwell JW, Escalante AA, Udhayakumar V, 2010. *pfmdr1* amplification and fixation of *pfcr* chloroquine resistance alleles in *Plasmodium falciparum* in Venezuela. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1572–1579.
- Vinayak S et al., 2010. Multiple genetic backgrounds of the amplified *Plasmodium falciparum* multidrug resistance (*pfmdr1*) gene and selective sweep of 184F mutation in Cambodia. *J Infect Dis* 201: 1551–1560.
- Inoue J, Jovel I, Morris U, Aydin-Schmidt B, Islam A, Segurado AC, Bjorkman A, Di Santi S, Martensson A, 2018. Absence of *Plasmodium falciparum* K13 propeller domain polymorphisms among field isolates collected from the Brazilian Amazon basin between 1984 and 2011. *Am J Trop Med Hyg* 99: 1504–1507.
- Menard D et al., 2016. A worldwide map of *Plasmodium falciparum* K13-propeller polymorphisms. *N Engl J Med* 374: 2453–2464.
- Itoh M et al., 2018. Efficacy of artemether-lumefantrine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Cruzeiro do Sul, Brazil, 2016. *Am J Trop Med Hyg* 98: 88–94.
- Ladeia-Andrade S, de Melo GN, de Souza-Lima Rde C, Salla LC, Bastos MS, Rodrigues PT, Luz F, Ferreira MU, 2016. No Clinical or molecular evidence of *Plasmodium falciparum* resistance to artesunate-mefloquine in northwestern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 95: 148–154.
- Sisowath C, Ferreira PE, Bustamante LY, Dahlstrom S, Martensson A, Bjorkman A, Krishna S, Gil JP, 2007. The role of *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. *Trop Med Int Health* 12: 736–742.
- Costa GL, Amaral LC, Fontes CJF, Carvalho LH, de Brito CFA, de Sousa TN, 2017. Assessment of copy number variation in genes related to drug resistance in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* isolates from the Brazilian Amazon and a systematic review of the literature. *Malar J* 16: 152.

Anexo 6 – artigo publicado na *Malaria Journal* em 2019

RESEARCH

Open Access



Field evaluation of malaria malachite green loop-mediated isothermal amplification in health posts in Roraima state, Brazil

Heather M. Kudyba¹, Jaime Louzada², Dragan Ljolje³, Karl A. Kudyba¹, Vasant Muralidharan^{1*} ,
Joseli Oliveira-Ferreira^{2,4*} and Naomi W. Lucchi^{3*}

Abstract

Background: Microscopic detection of malaria parasites is the standard method for clinical diagnosis of malaria in Brazil. However, malaria epidemiological surveillance studies specifically aimed at the detection of low-density infection and asymptomatic cases will require more sensitive and field-usable tools. The diagnostic accuracy of the colorimetric malachite green, loop-mediated, isothermal amplification (MG-LAMP) assay was evaluated in remote health posts in Roraima state, Brazil.

Methods: Study participants were prospectively enrolled from health posts (healthcare-seeking patients) and from nearby villages (healthy participants) in three different study sites. The MG-LAMP assay and microscopy were performed in the health posts. Two independent readers scored the MG-LAMP tests as positive (blue/green) or negative (clear). Sensitivity and specificity of local microscopy and MG-LAMP were calculated using results of PET-PCR as a reference.

Results: A total of 91 participants were enrolled. There was 100% agreement between the two MG-LAMP readers ($\text{Kappa} = 1$). The overall sensitivity and specificity of MG-LAMP were 90.0% (95% confidence interval (CI) 76.34–97.21%) and 94% (95% CI 83.76–98.77%), respectively. The sensitivity and specificity of local microscopy were 83% (95% CI 67.22–92.66%) and 100% (95% CI 93.02–100.00%), respectively. PET-PCR detected six mixed infections (infection with both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*); two of these were also detected by MG-LAMP and one by microscopy. Microscopy did not detect any *Plasmodium* infection in the 26 healthy participants; MG-LAMP detected *Plasmodium* in five of these and PET-PCR assay detected infection in three. Overall, performing the MG-LAMP in this setting did not present any particular challenges.

Conclusion: MG-LAMP is a sensitive and specific assay that may be useful for the detection of malaria parasites in remote healthcare settings. These findings suggest that it is possible to implement simple molecular tests in facilities with limited resources.

Keywords: Malaria, *Plasmodium*, Malachite green loop-mediated isothermal amplification, Diagnosis

*Correspondence: vasant@uga.edu; lila@ioc.fiocruz.br; frd9@cdc.gov

¹ Center for Tropical and Emerging Global Diseases (CTEGD), University of Georgia, Athens, USA

² Federal University of Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil

³ Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA

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



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Malaria is a devastating disease that remains a major global health burden. The illness arises from infection with parasites of the genus *Plasmodium*. Cases of the most significant morbidity and mortality in humans are caused by the most prevalent species, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* also cause human malaria, but the infections are typically associated with milder symptoms. In 2017, an estimated 219 million cases of malaria occurred worldwide [1]. Most malaria cases in 2017 were reported in sub-Saharan Africa (200 million, 92%). The WHO Region of the Americas recorded a rise, largely due to increases in malaria transmission in Brazil, Nicaragua, and Venezuela [1]. In Brazil, the vast majority of malaria cases are concentrated in the Brazilian Amazon Region. The State of Roraima in Brazil is located in the Amazon region in the far north on the border with Venezuela and Guyana. In 2017, Roraima reported 11,966 cases of malaria, which was a 44% increase compared to 2016 (8307) [2]. Based on data from the Brazilian Secretariat of Health Surveillance, 50% of patients seen in the State of Roraima were residents of Venezuela and Guyana. There is frequent movement of the population and vectors in the border region, and access to preventive healthcare in Venezuela and Guyana is limited. Control of malaria in Roraima is endangered and the border area is vulnerable to malaria outbreaks and epidemics.

One of the challenges for malaria surveillance and control programmes is the timely identification of low-density infections not detected by the routine diagnostic tests: microscopy and standard rapid diagnostic tests (RDTs). Currently, the primary method used in Brazil for the diagnosis of malaria is microscopy of a Giemsa-stained thick or thin blood smear, but there are limitations of microscopy, including inability to detect very low density (sub-microscopic) parasitaemia, occasional misdiagnosis of mixed-species infection, and the fact that it is time consuming [3–7]. A majority of sub-microscopic infections are asymptomatic. Individuals who are asymptomatic do not seek treatment resulting in a population of individuals with persistent infections, capable of transmitting malaria in the population, (reviewed in [8]). It is important to identify and treat persons with these low-level parasitaemia during malaria epidemiological surveys. Furthermore, the elimination of malaria will require active case detection in low transmission areas as well as the ability to detect sub-microscopic infections [9]. There is a need to develop and validate sensitive diagnostic tools. Molecular-based diagnostic tools provide more sensitive and specific methods for detecting *Plasmodium* infections than microscopy and RDTs. For a ‘significant improvement’ over expert microscopy, it is

recommended that molecular tests be at least 1 log more sensitive than microscopy; preferably have a detection limit of 2 parasites/ μL or fewer [10]. The use of molecular-based diagnostic tools in research and in epidemiological surveys has expanded in recent years. However, their use is limited to laboratories with more sophisticated facilities, due to the requirement for specialized equipment and technical expertise. Simpler molecular tests, such as the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays, promise to facilitate the use of molecular tests even in facilities with limited resources [11–15].

As recently reviewed [16], several malaria LAMP-based assays have been described to date. Many of these have excellent diagnostic performance, e.g., detecting as few as 1 parasite/ μL (*illumigene* LAMP), or 1–5 parasites/ μL (EIKEN LAMP), however, they are not without limitations, which include the requirement for additional equipment for read-out, the limited number of samples tested per run, and the fact that some are capable of detecting malaria parasites at genus level only. Recently, the development of a malaria malachite green loop-mediated isothermal amplification (MG-LAMP) as a LAMP method for diagnosing *Plasmodium* infection was reported [17]. Three factors make the MG-LAMP assay appealing: (1) performance of the MG-LAMP assay requires only a small portable heat block and mini-centrifuge; (2) it is a colorimetric assay that does not require any special read-out equipment; and, (3) the heat block used has a 38-sample capacity allowing for the testing of many samples at once, with the potential for use in large-scale studies. To date, only two other high through-put (HTP) colorimetric malaria LAMP assays have been described [18, 19].

In this study, the performance of the MG-LAMP assay was tested in health posts of three municipalities of Roraima, Brazil using freshly isolated patient samples. The MG-LAMP diagnosis was compared to results provided by local microscopists at the sites of study. The sensitivity and specificity of MG-LAMP performed in these remote health posts, with limited laboratory infrastructure, were compared to that of a real-time PCR (PET-PCR) [20] assay.

Methods

Collection of clinical samples

This prospective study was carried out between July and August 2017 in malaria health posts in three municipalities of Roraima, Brazil (Boa Vista, Pacaraima, Rorainópolis). All patients attending the health posts for malaria screening and treatment were eligible to be enrolled in the study. In addition, healthy controls were enrolled from houses near the health posts. Blood samples were obtained from all enrolled patients by venipuncture. Enrolled patients were tested for malaria by a trained local microscopist

using 10% Giemsa-stained thick blood smear, and the diagnosis and parasitaemia level were recorded for each patient. Additionally, all consenting patients filled out a clinical questionnaire that addressed whether the patient had symptoms, their age, gender, residence, and whether they had prior *Plasmodium* infections.

LAMP logistics

Blood sample collection and processing, microscopy, DNA extraction, and MG-LAMP assays were all performed in the malaria health posts in Roraima by a USA-based graduate student with training in molecular biology but with no field experience. Two laboratory technicians with no previous experience with LAMP were trained to read the MG-LAMP results. To simplify the MG-LAMP procedure, a three-component ready-to-use kit was used: component I contained all the necessary reaction components for the assay (LAMP buffer: 40 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM KCl, 16 mM MgSO₄, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween-20, 0.8 M Betaine, and 2.8 mM of dNTPs and the primers (stored in a 4 °C refrigerator); component II contained the Bst polymerase (stored at -20 °C), and component III contained 0.2% malachite green dye. To perform the assay, 13.8 µL of Component I was mixed with 0.8 µL of the Bst polymerase and 0.4 µL of the malachite green dye for a final concentration of malachite green of 0.008%. Five µL of DNA template was added and the tubes were placed in the preheated heat block.

DNA extraction

The DNA extraction was performed in small rooms within the health posts. DNA was extracted from 200 µL of whole blood using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc, Chatsworth, CA, USA). The manufacturer's provided DNA extraction protocol was slightly modified in that all of the spins were performed at 2000 g using a mini-centrifuge (Myfuge™) that was easily transported in the field setting.

LAMP method

All samples were screened for *Plasmodium* using the genus assay as described previously [17] in a final reaction volume of 20 µL. Samples were incubated for 1 h at 63 °C in a mini heat block (GeneMate, Bioexpress, Utah, USA) to amplify the DNA. Following the 1-h incubation, samples were removed from the heat block and allowed to cool for 15 min, the results were then scored by two independent readers as being positive (light blue/green) or negative (clear/colourless). Positive and negative controls were included during each run using *P. falciparum* 3D7 DNA or nuclease-free water, respectively. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* species-specific MG-LAMP assays were carried out on all samples that were positive by the genus assay. These assays were performed

using the 3-component ready-to-use in-house kits prepared using previously published *P. falciparum* and *P. vivax* primers [21, 22]. Each reaction contained 5 µL of isolated DNA in a final reaction volume of 20 µL. Positive controls included a *P. falciparum*-positive sample and a *P. vivax*-positive sample. Nuclease-free water was included as a negative control.

PET-PCR method

DNA samples were shipped to the malaria branch laboratory at the CDC using cold packs. *Plasmodium* genus-specific PET-PCR was performed in duplicate as described previously except that 5 µL of DNA was used instead of 2 µL [20]. The reactions contained 2× TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 250 nM of Genus forward Primer and FAM-Genus reverse primer, and 5 µL of isolated DNA for a final volume of 20 µL. The PET-PCR reaction was run using an Agilent Mx3005pro thermocycler (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using the following cycling parameters: 15 min initial hot-start at 95 °C followed by 45 cycles of denaturing at 95 °C for 20 s, annealing at 63 °C for 40 s, and an extension of 30 s at 72 °C. A positive and negative control, 3D7 and nuclease-free water, respectively, were included in each run. Samples were designated as positive if they had a threshold cycle (Ct) value below 40.0 and negative if they had no Ct value or Ct values above 40.0. Species-specific PET-PCR was performed in duplicate on all samples that were positive by the genus specific PET-PCR, using species-specific primers. *P. falciparum* and *P. ovale* PET-PCR primers have been used and verified previously [20, 23]. *P. malariae* and *P. vivax* PET-PCR primers can be found in Table 1. Two duplex reactions were set up to detect *P. ovale* together with *P. falciparum* and *P. malariae* together with *P. vivax*. The duplexed reactions were 20 µL containing 2× TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems), 250 nM of FAM-*P. ovale* forward primer, 250 nM *P. ovale* reverse primer, 250 nM of *P. falciparum* forward primer, 125 nM of HEX-*P. falciparum* reverse primer, 250 nM *P. malariae* forward primer, 250 nM FAM-*P. malariae*, 125 nM *P. vivax* forward primer, 125 nM HEX-*P. vivax* reverse primer and 5 µL of isolated DNA. Reactions were run using the same cycling conditions as the Genus PET-PCR. Positive controls consisting of samples with known *Plasmodium* species and nuclease-free water as a negative control were included in each run.

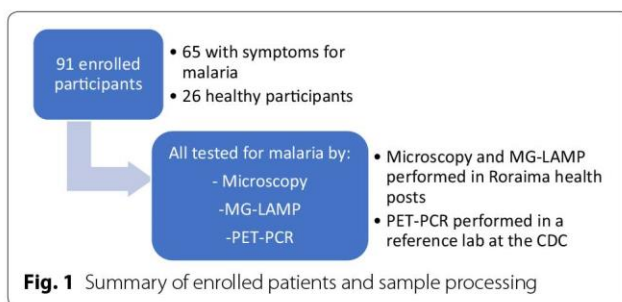
Statistical analyses

The percentage specificity and sensitivity were calculated as follows: Sensitivity = true positives / (true positives + false negatives) × 100. Specificity = true negatives / (true negatives + false positives) × 100. In addition, 95% Confidence Intervals (95% CI) for both sensitivity and

Table 1 PET-PCR primers utilized in the evaluation

Primer	Sequence
<i>P. vivax</i> Forward	5'-ACT GAC ACT GAT GAT TTA GAA CCC ATT T-3'
HEX- <i>P. vivax</i> Reverse	5'-agg cgc ata gcg cct ggT GGA GAG ATC TTT CCA TCC TAA ACC T-3'
<i>P. malariae</i> Forward	5'-AAGGCAGTAACACCAGCAGTA-3'
FAM- <i>P. malariae</i> Reverse	5'-agg cgc ata gcg cct ggTCCCATGAAGTT ATATCCCGCTC-3'

HEX-labelled: based on the *plasmepsin* gene; FAM-labelled: based on *dihydrofolate reductase-thymidylate synthase* (DHFR-TS) gene



specificity were calculated. The agreement between the human readers and diagnostic tests was assessed by calculating the Kappa coefficients. 95% CIs were calculated using MEDCALC® and GraphPad.

Results

Patient enrolment

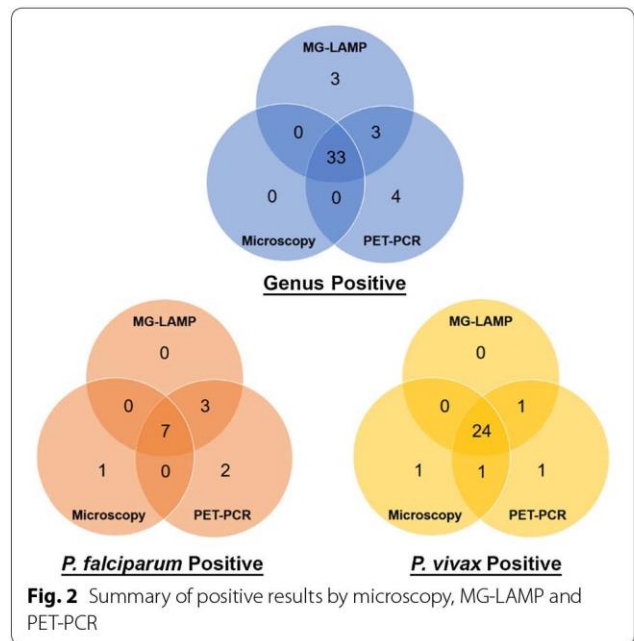
A total of 91 participants were enrolled during the 2 months of the study: 65 patients presenting with malaria symptoms (axillary temperature ≥ 37.5 °C) at the health posts and 26 healthy participants from nearby villages (Fig. 1). None of the 26 healthy participants exhibited any symptoms of malaria. Of the 91 enrolled participants, 86 (94.5%) reported having had previous malaria infections while 4 (4.4%) had no previous malaria, and 1 (1.1%) did not provide this information.

Agreement between human readers for the MG-LAMP assay

Overall, performing the MG-LAMP in this setting did not present any particular challenges. Two independent human readers scored the MG-LAMP tests as positive or negative. There was 100% agreement between the two readers (Kappa=1).

Overall results of microscopy, MG-LAMP, and PET-PCR

Of the 91 samples, 33 (36%) were malaria positive by microscopy, 39 (43%) were positive by MG-LAMP, and 40 (44%) were positive by PET-PCR (Fig. 2). All samples were negative for *P. malariae* and *P. ovale*.



Specificity and sensitivity of MG-LAMP and microscopy compared to PET-PCR

The sensitivity and specificity of the MG-LAMP assays and microscopy were calculated using PET-PCR as a reference test (Table 2).

Agreement of MG-LAMP with PET-PCR

The data show that *Plasmodium* genus assay for MG-LAMP and PET-PCR agreed 92.3% of the time (Kappa=0.84, 95% CI 0.732–0.955). When comparing *P. falciparum* and *P. vivax* MG-LAMP and PET-PCR assays, there was 97.8% (Kappa=0.89, 95% CI 0.735–1.000) and 96.7% (Kappa=0.92, 95% CI 0.839–1.000) agreement between the two tests, respectively.

Detection of mixed infections

Microscopy detected one mixed *P. falciparum* and *P. vivax* infection, which was detected to be a *P. falciparum* only infection by both the MG-LAMP and PET-PCR assays. There were six mixed infections detected by PET-PCR; two of these were also identified by MG-LAMP but none was identified by microscopy. In the four cases where the MG-LAMP did not detect the mixed infections identified by the PET-PCR, the Ct values were high, suggesting low parasite density infections (Table 3).

Detection of parasitaemia in asymptomatic patients

Of the 26 enrolled healthy participants, five were positive for *Plasmodium* by MG-LAMP and three were positive for *Plasmodium* by PET-PCR assay. None of these was positive by microscopy (Table 4). Four of the five cases

that were positive by MG-LAMP were positive only at genus level and the infecting species could not be determined (Table 4). Two of these samples were positive by both MG-LAMP and PET-PCR, one only at genus level.

Discordant results

Seven samples were found to have discordant results among the three tests (Table 5). Four of these samples were negative by microscopy and MG-LAMP but

positive by PET-PCR. Three of these samples were positive by PET-PCR genus test and negative by species tests, while one was positive by PET-PCR *P. vivax* (Table 5). In these four cases, the Ct values by PET-PCR were all above 35.0. Three samples yielded a positive MG-LAMP genus test but were negative for the MG-LAMP *P. falciparum* and *P. vivax* tests and by both microscopy and PET-PCR (Table 5).

Table 2 Sensitivity and specificity of MG-LAMP and microscopy using PET-PCR as a reference

	Method	Sensitivity	Specificity
Genus ^a	Microscopy (n=91)	83% (95% CI 67.22–92.66%)	100% (95% CI 93.02–100.00%)
	MG-LAMP (n=91)	90% (95% CI 76.34–97.21%)	94% (95% CI 83.76–98.77%)
<i>P. falciparum</i>	Microscopy (n=91)	64% (95% CI 93.02–100.00%)	99% (95% CI 93.23–99.97%)
	MG-LAMP (n=39)	82% (95% CI 48.22–97.72%)	100% (95% CI 95.49–100.00%)
<i>P. vivax</i>	Microscopy (n=91)	83% (95% CI 65.28–94.36%)	98% (95% CI 91.20–99.96%)
	MG-LAMP (n=39)	90% (95% CI 73.47–97.89%)	100% (95% CI 94.13–100.00%)

^a Samples which were negative for genus were considered to be negative for species in the sensitivity and specificity calculations

Table 3 Detection of mixed infections by PET-PCR, MG-LAMP and microscopy

Sample	Microscopy diagnosis	MG-LAMP diagnosis	PET-PCR diagnosis	PET-PCR CT value for <i>P. falciparum</i>	PET-PCR CT value for <i>P. vivax</i>
PC121	<i>P. vivax</i>	Mixed	Mixed	22.68	28.50
PC123	<i>P. falciparum</i>	Mixed	Mixed	26.56	39.90
BV237	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	Mixed	35.10	29.12
BV217	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	Mixed	36.24	32.23
BV239	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Mixed	31.37	35.38
BV241	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	Mixed	29.43	39.92
BV240	Mixed ^a	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	37.82	No Ct

^a Only one *P. vivax* parasite was seen by microscopy for this sample

Table 4 Results of MG-LAMP and PET-PCR in asymptomatic patients

Sample	Microscopy diagnosis	MG-LAMP diagnosis	PET-PCR genus (Ct value)	PET-PCR <i>P. vivax</i> (Ct value)	PET-PCR <i>P. falciparum</i> (Ct value)
RR09	Negative	Genus only	Negative (40.70)	Negative (No Ct)	Negative (No Ct)
RR10	Negative	Genus only	Negative (41.76)	Negative (No Ct)	Negative (No Ct)
RR37 ^a	Negative	<i>P. vivax</i>	Positive (32.74)	Positive (35.96)	Negative (No Ct)
RR41 ^a	Negative	Genus only	Positive (38.76)	Negative (41.99)	Negative (No Ct)
RR42	Negative	Genus only	Negative (40.74)	Negative (41.69)	Negative (No Ct)
RR53	Negative	Negative	Positive (34.99)	Positive (39.09)	Negative (No Ct)

^a Samples shown to be positive by both MG-LAMP and PET-PCR

Discussion

The findings presented in this study demonstrate the accuracy of the MG-LAMP as a malaria diagnostic test in remote health posts in a malaria-endemic country. Importantly, these data demonstrate that the MG-LAMP is sensitive at identifying infections not detectable by microscopy. Additionally, the results establish that this assay, like the PET-PCR assay used as a reference test in this study, is capable of detecting mixed infections that microscopy missed. However, the MG-LAMP assay missed four positive samples and four mixed infections detected by PET-PCR. These missed infections were all shown to be of much lower parasite densities (based on the high Ct values (between 35 and 39) in the PET-PCR assay. Extrapolation using previously obtained PET-PCR data shows that a Ct value of 35.0 corresponds to about 16 parasites/ μL [20], therefore, the missed samples likely had parasite densities of about 16 parasites/ μL (3 samples) and below (5 samples). While a detection limit of 16 parasites/ μL is much better than that for routine microscopy, it is below the detection limits of many PCR-based assays and some previously published LAMP-based assays, which claim detection limits below 16 parasites/ μL . Previously, the malaria MG-LAMP assay was shown to have a limit of detection of 1–8 parasites/ μL [17] using quantified standard curves, however, this limit of detection did not hold when the assay was performed in a field setting. More sensitive MG-LAMP primers or a change in assay conditions may be required to achieve the same level of diagnostic accuracy as the PET-PCR assay in field settings. In addition, there were three cases where MG-LAMP yielded a positive genus result, while microscopy and PET-PCR were negative. It is likely that these are false positives by the MG-LAMP assay, however, one cannot rule out that these are indeed true positives missed by PET-PCR, a phenomenon that has been observed before in evaluation studies using low-density infection samples [11, 12].

While PCR-based assays, such as PET-PCR, have superior sensitivity for diagnosing low-density infections, they

are far more complicated procedurally compared to the MG-LAMP, as they require costly equipment and supplies. The MG-LAMP assay evaluated in this study can be performed using a small portable heat block and mini-centrifuge and does not require any special read-out equipment since it is a colorimetric assay. It is an appealing test for use in resource-limited facilities. In addition, it has a 38-sample capacity allowing for HTP testing and therefore has the potential for use in large-scale studies. Further investment in refining simple molecular tests to increase sensitivity would allow them to be used in resource-limited settings for the detection of low-density infections.

A limitation of the current format of the MG-LAMP is the fact that the LAMP buffers and polymerase require cold chain, which is not ideal in more resource-limited settings. Currently, there are two available malaria LAMP assays that do not require a cold chain: the EIKEN LAMP and *illumigene* LAMP, but each of these have limitations, reviewed in [16]. For example, the *illumigene* LAMP assay is a genus-specific test only and is only capable of testing 10 samples per run. Elimination of the need for a cold chain will be required if the MG-LAMP assay is to be used in settings without a laboratory. However, in facilities similar to the health posts used in this study, the current format of MG-LAMP assay can be performed. The use of DNA extracted using commercially available blood kits should be avoided as this adds extra steps and cost to the test; the use of boil-and-spin DNA isolation should be further explored in future field studies.

Although healthy participants were enrolled in an effort to estimate the ability of the MG-LAMP to detect asymptomatic parasitaemia, the number of healthy participants was too low to draw firm conclusions.

Conclusion

Overall, MG-LAMP evaluated in this study provided a portable, sensitive and specific assay for the detection of malaria parasites in a remote health clinic in Brazil when

Table 5 Summary of discordant results

Sample	Microscopy diagnosis	MG-LAMP genus diagnosis	PET-PCR genus (Ct value)	PET-PCR <i>P. vivax</i> (Ct value)	PET-PCR <i>P. falciparum</i> (Ct value)
RR53	Negative	Negative	Positive (34.99)	Positive (39.09)	Negative (No Ct)
BV235	Negative	Negative	Positive (35.78)	Negative (No Ct)	Negative (No Ct)
RR01	Negative	Negative	Positive (37.96)	Negative (No Ct)	Negative (No Ct)
BV236	Negative	Negative	Positive (39.34)	Negative (No Ct)	Negative (No Ct)
RR09	Negative	Positive	Negative (40.70)	Negative (No Ct)	Negative (No Ct)
RR10	Negative	Positive	Negative (41.76)	Negative (No Ct)	Negative (No Ct)
RR42	Negative	Positive	Negative (40.74)	Negative (41.69)	Negative (No Ct)

compared to microscopy. However, the current format of the assay was not sensitive enough to be recommended for detection of low-density infections and improvements will be required to enhance its sensitivity and if possible, to make it a more field usable tool that does not require a cold-chain.

Abbreviations

MG-LAMP: malachite green loop-mediated isothermal amplification; RDT: rapid diagnostic test; HTP: high through-put; PET-PCR: photo-induced electron transfer-polymerase chain reaction; CI: confidence interval; CT: cycle threshold.

Authors' contributions

HMK, JL, DL, KAK, JOF, and NWL made substantial contributions to the conception and design, acquisition of data, and analysis/interpretation of data. HMK, VM, JOF, and NWL were involved drafting the manuscript and revising it critically for important intellectual content. HMK, VM, JOF, and NWL agree to be accountable for all aspects of this work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of this work are appropriately investigated and resolved. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Center for Tropical and Emerging Global Diseases (CTEGD), University of Georgia, Athens, USA. ² Federal University of Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil. ³ Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA. ⁴ Institute Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Acknowledgements

We would like to thank all the patients who enrolled in this study and made this work possible and the Secretary of Health of Roraima and the local malaria control program team of Boa Vista, Pacaraima and Rorainópolis for their logistical support.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

Please contact the corresponding author for data requests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

This study was part of a larger study approved by the Federal University of Roraima Ethical Committee (CAAE: 44055315.0.0000.5302). Written informed consent was obtained from all participants. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) investigators provided technical advice but did not have direct contact with study participants or access to any personally identifiable information and were considered not to be engaged in the research (Protocol 2017-105).

Funding

This work was supported by the US National Institutes of Health to H.M.K (T32AI060546). JOF is recipient of Research Productivity Fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The findings and conclusions in this report are those of the author(s) and do not necessarily represent the official position of the Centers for Disease Control and Prevention.

Publisher's Note

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

Received: 20 September 2018 Accepted: 12 March 2019

Published online: 25 March 2019

References

1. WHO. World malaria report. Geneva: World Health Organization; 2018.
2. PAHO. Epidemiological alert: increase of malaria in the Americas. Washington: Pan American Health Organization; 2018.
3. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:119–27.
4. Tajebe A, Magoma G, Aemero M, Kimani F. Detection of mixed infection level of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* by SYBR Green I-based real-time PCR in North Gondar, north-west Ethiopia. *Malar J.* 2014;3:411.
5. Ehtesham R, Fazaeli A, Raeisi A, Keshavarz H, Heidari A. Detection of mixed-species infections of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* by nested PCR and rapid diagnostic tests in southeastern Iran. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93:181–5.
6. Krishna S, Bharti PK, Chandel HS, Ahmad A, Kumar R, Singh PP, et al. Detection of mixed infections with *Plasmodium* spp. by PCR, India, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:1853–7.
7. Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MM, Mens PF. Molecular malaria diagnostics: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016;53:87–105.
8. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2009;200:1509–17.
9. WHO. A framework for malaria elimination. Geneva: World Health Organization; 2017.
10. WHO. Evidence review group on malaria diagnosis in low transmission settings. Geneva: World Health Organization; 2014. http://www.who.int/malaria/mpac/mpac_mar2014_diagnosis_low_transmission_settings_report.pdf.
11. Cook J, Aydin-Schmidt B, Gonzalez IJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. *Malar J.* 2015;14:43.
12. Hopkins H, Gonzalez IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C, et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. *J Infect Dis.* 2013;208:645–52.
13. Lucchi NW, Demas A, Narayanan J, Sumari D, Kabanyanyi A, Kachur SP, et al. Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria. *PLoS ONE.* 2010;5:e13733.
14. Polley SD, Mori Y, Watson J, Perkins MD, Gonzalez IJ, Notomi T, et al. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2866–71.
15. Oriero EC, Jacobs J, Van Geertruyden JP, Nwakanma D, D'Alessandro U. Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:2–13.
16. Lucchi NW, Ndiaye D, Britton S, Udhayakumar V. Expanding the malaria molecular diagnostic options: opportunities and challenges for loop-mediated isothermal amplification tests for malaria control and elimination. *Expert Rev Mol Diagn.* 2018;18:195–203.
17. Lucchi NW, Ljolje D, Silva-Flannery L, Udhayakumar V. Use of malachite green-loop mediated isothermal amplification for detection of *Plasmodium* spp. parasites. *PLoS ONE.* 2016;11:e0151437.
18. Britton S, Cheng Q, Grigg MJ, William T, Anstey NM, McCarthy JS. A sensitive, colorimetric, high-throughput loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Plasmodium knowlesi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95:120–2.
19. Britton S, Cheng Q, Sutherland CJ, McCarthy JS. A simple, high-throughput, colourimetric, field applicable loop-mediated isothermal amplification (HtLAMP) assay for malaria elimination. *Malar J.* 2015;14:335.
20. Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, DaSilva AJ, et al. Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR. *PLoS ONE.* 2013;8:e56677.
21. Yamamura M, Makimura K, Ota Y. Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification, and melting curve analysis. *Jpn J Infect Dis.* 2009;62:20–5.
22. Patel JC, Oberstaller J, Xayavong M, Narayanan J, DeBarry JD, Srinivasamoorthy G, et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the species-specific identification of *Plasmodium vivax*. *PLoS ONE.* 2013;8:e54986.
23. Akerele D, Ljolje D, Talundzic E, Udhayakumar V, Lucchi NW. Molecular diagnosis of *Plasmodium ovale* by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR. *PLoS One.* 2017;12:e0179178.