Pablo Secato Fontoura

Perspectivas para eliminação da malária residual em área rural
da Amazônia brasileira: Estratégia de Busca Ativa Reativa na
identificação de reservatórios de *Plasmodium vivax*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Parasitologia).

São Paulo
2016

Pablo Secato Fontoura

Perspectivas para eliminação da malária residual em área rural
da Amazônia brasileira: Estratégia de Busca Ativa Reativa na
identificação de reservatórios de *Plasmodium vivax*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Parasitologia).

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Versão corrigida. A versão original eletrônica,
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB
quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações
da USP (BDTD)

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Fontoura, Pablo Secato

Perspectivas para eliminação da malária residual em área rural da Amazônia brasileira: Estratégia de Busca Ativa Reativa na identificação de reservatórios de Plasmodium vivax. / Pablo Secato Fontoura; orientador Marcelo Urbano Ferreira. -- São Paulo, 2016.

326 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Malária. 2. Busca Ativa Reativa. 3. Amazônia.
I. Ferreira, Marcelo Urbano, orientador. II. Título.

Decl. BMP/CPG-221/2016

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Sr. **PABLO SECATO FONTOURA** defendeu o título de **DOUTOR EM CIÊNCIAS**, Área: **Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro**, tendo sido aprovado em prova pública da Tese de Doutorado, realizada no dia 09 de dezembro de 2016 e que, oportunamente, será homologada pela Comissão de Pós-Graduação. O trabalho apresentado tem como título: **"Perspectivas para eliminação da malária residual em área rural da Amazônia brasileira. Estratégia de busca ativa reativa na identificação de reservatórios de *Plasmodium vivax*"**. A Comissão Julgadora foi constituída pelos seguintes membros: Profs. Drs. Marcos Boulos, Guilherme Loureiro Werneck, Sílvia Maria Fátima Di Santi e Marcelo Urbano Ferreira (Orientador).

São Paulo, 09 de dezembro de 2016

Profa. Dra. BEATRIZ SIMONSEN STOLF CARBONI

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
BIOLOGIA DA RELAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO ICB/

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de março de 2013.

PARECER 1105/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, na sessão realizada no dia 27.02.2013, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Investigação de reservatórios para malária residual por Plasmodium vivax em área rural da Amazônia*" do pesquisador **MARCELO URBANO FERREIRA** e aluno **PABLO SECADO FONTORA**.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c. conforme modelo constante no site.icb.usp.br.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **27.02.2014**.

Atenciosamente,

Prof. Dra. **PAOLO M.A. ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 08/04/2013
REL. N.º 1220

Aos irmãos Cleicenildo,
André, Alice, Anderson, Leonardo
e Eduardo, por dias melhores.

A todos agentes de
endemias pela batalha diária.

AGRADECIMENTOS

Aos meus **pais (Vera e Edison)** e à minha **família**, especialmente aos tios **Dejair** (*in memoriam*) e **Ângela** pela confiança, incentivo e auxílio em todos os momentos dessa empreitada. Agradeço também a minha tia **Marli Fontoura** e **Eduardo Ferreti** pelo apoio fundamental no início dessa caminhada.

Ao professor **Marcelo U. Ferreira** pela confiança, orientação e oportunidade em desenvolver este motivador projeto e, principalmente pela amizade construída durante esta jornada.

Aos **moradores de Acrelândia**, especialmente das localidades, onde sem a participação dos quais esse estudo não teria acontecido.

Gostaria também de agradecer-los pela convivência, pela maneira gentil que nos receberam – por diversas vezes – em suas residências e pelos muitos cafés e almoços fora de horário.

À **Bruna Finco** pela convivência e parceria no trabalho de campo e pela ajuda fundamental na etapa de coleta de dados. Tenho certeza que deixamos um pouco de nós no Acre.

Aos **servidores do centro de endemias** do município de Acrelândia – especialmente ao **Antonio Vasconcelos (“Tonho”)**, **Clenilton Magno (“Doido”)**, **Juvenal Arcanjo**, **Cleide Nunes**, **José Ribamar Duarte**, **Carlos Silva (“Carlão”)**, **Emerson**, **Evandro (“Véio do rio”)** e **Aquino Gomes** - pelo trabalho em conjunto, pela excelente convivência e por não desistirem do objetivo de eliminar a malária no município mesmo diante das constantes adversidades.

Aos **gestores municipais** do Município de Acrelândia por nos concederem um espaço na Unidade Básica de Saúde para a instalação de nosso laboratório.

A **Maria A. da Silva** pelo cuidado e carinho que sempre dispensou a todas as equipes de pesquisa que passaram por nossa casa em Acrelândia. Faz falta nossas conversas diárias, o café e os bons pratos que preparava.

À **Francisco Naildo C. Leitão** e ao professor **Pascoal T. Muniz** pela amizade e pelo suporte logístico no Acre.

Aos professores e amigos, **Carlos Cavasini**, **Mônica Nunes**, **Kézia Katiane Scopel**, **Márcia Castro**, **Ariel Silber**, **Paulo Ribolla**, **Simone Ladeia** e **Paulo Moutinho (“Soneca”)** pelos ensinamentos e convivência durante os trabalhos de campo na Amazônia.

A **Márcia C. Castro**, **Malla R. Rao**, **Paola B. Marchesini**, **Ana Carolina Santelli** e **André Siqueira** pelos valiosos comentários e sugestões acerca do desenho deste estudo.

Ao **Jaques Franco** pela realização dos exames moleculares.

À **Camilla Batista, Carmen Takata e Priscila Tihara** pelo auxílio na tipagem dos marcadores moleculares.

À toda **equipe do laboratório 29 e 33** sob responsabilidade do professor Marcelo U. Ferreira pela boa convivência durante esses quatro anos. Em especial à **Vanessa Nicolete e Amanda Gozze** pelo marcante início dos trabalhos de campo no Remansinho no ano de 2010, além dos bons churrascos (com Pacenã) e forró no Cebolinha.

Ao **XIX Seminário Laveran & Deane** pela oportunidade de apresentar e discutir este projeto de pesquisa.

Aos membros da comissão julgadora de minha qualificação, **Prof. Rita Barata, Prof. Guilherme Werneck** e Prof. **Cláudio Marinho** pelas valiosas sugestões e correções em relação ao desenvolvimento deste estudo.

À prof. **Marly Cardoso** e **toda sua equipe de pesquisa** pela amizade e oportunidade de participação em projetos científicos.

Aos **funcionários do ICB/USP, FSP/USP e IMT/USP** pela boa convivência durante todos esses anos.

À **minha família acreana – Tampinha e Adamilson** – pelos muitos churrascos e por terem me colocado ao lado de seus familiares fazendo com que me sentisse em casa.

A amiga **Maria J. Menezes (Zezé)** pelo suporte logístico em nosso laboratório de pesquisa e pela valiosa amizade, incentivo e bons conselhos durante todos esses anos.

A minha amiga (corintiana) **Bárbara Lourenço**, pela amizade e parceria nos trabalhos com as crianças de Acrelândia, além das nossas intermináveis discussões futebolísticas (Palmeiras *versus* Corinthians).

Aos **amigos Márcio Desidério e Cleber Moreto** pelo apoio desde os tempos de trabalho na agricultura e no Laticínio Segatti e por me motivarem a prosseguir nos estudos.

Aos **amigos do time amador do Américo de Campos Futebol Clube**, especialmente ao **Adélio, Liu, Fião e Willian**, por sempre me aceitarem no time nas vezes que retornei à minha cidade natal. E ao **Silomar** por disponibilizar seu bar para as comemorações (noturnas) das muitas vitórias e derrotas da equipe.

Às agências de fomento que auxiliaram este projeto científico, **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, **Ministério da Saúde do Brasil** e **National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)**, **National Institutes of Health (NIH)**, Estados Unidos da América.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da bolsa de doutorado durante os quatro anos de desenvolvimento deste estudo.

E finalmente, à **Eliaana Cubillos** pelo companheirismo, compreensão e pelas muitas risadas no dia-a-dia. Obrigado por estar ao meu lado em todos os momentos e, principalmente por compartilharmos sonhos e objetivos.

“Malária? Ainda existe essa doença por esses lados? Isso é muito ruim. Escuta! E o que vocês da saúde estão fazendo que não resolveram isso ainda?”

(Sr. M.M.S, 60 anos, morador do Ramal da Eletrônica, Acrelândia, Acre, 2013)

RESUMO

Fontoura PS. Perspectivas para eliminação da malária residual em área rural da Amazônia brasileira: Estratégia de Busca Ativa Reativa na identificação de reservatórios de *Plasmodium vivax*. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2016.

Casos de malária no Brasil atingiram seu nível mais baixo em 35 anos e o *Plasmodium vivax* é responsável por 85% dos casos em todo o país. A vigilância epidemiológica da transmissão residual da malária persistente na Amazônia é o próximo grande desafio para os esforços vigentes de eliminação. Esta situação nos levou a avaliar uma estratégia para detecção de portadores do parasito (sintomáticos ou não) em áreas que se aproximam a eliminação da malária. Nossa hipótese é que o monitoramento sistemático de moradores de domicílios com um ou mais casos de malária vivax clínica confirmados pela vigilância passiva de rotina (referido como casos índices) e seus vizinhos tem um melhor custo-benefício na identificação de novas infecções em relação aos inquéritos em massa da população em geral. Para testar essa hipótese, foram recrutados 41 casos índices (24 indivíduos classificados como autóctones, 11 como possíveis recaídas e, seis como casos importados), 163 moradores dos domicílios índices (indivíduos morando na mesma residência do caso índice), 878 moradores vizinhos (moradores de domicílios a um raio de < 3 km) e 841 controles (moradores da mesma localidade, porém a > 5 km de distância do domicílio índice) entre os meses de janeiro a julho de 2013. Participantes residiam em comunidades rurais pertencentes a Acrelândia, onde o *P. vivax* é a única espécie implicada na transmissão da malária humana. Todos os participantes foram convidados a fornecerem amostra de sangue capilar para realização do diagnóstico para malária no momento de identificação do caso índice (dia 0), 30, 60 e 180 dias após a primeira visita. Em geral, 6028 análises por microscopia revelaram um aumento na prevalência de malária nos domicílios índices (6,1%; *odds ratio* [OR] = 36,3, $P < 0,001$) e vizinhos (2,6%; OR = 13,6, $P < 0,001$) comparados aos controles (0,1%). Não houve casos positivos para *P. falciparum*. Moradores dos domicílios índices e vizinhos foram associados com uma maior probabilidade de infecção pelo *P. vivax* em comparação com os indivíduos controles, após análise ajustada por potenciais confundidores (modelos de regressão logística para efeitos mistos), além desses participantes albergarem > 90% da biomassa parasitária circulante. Nos quatro

seguimentos da RCD a microscopia identificou somente 49,5% das infecções diagnosticadas por qPCR, porém 76,8% do total da carga parasitária circulante nas proximidades do domicílio índice. Embora, moradores dos domicílios controles foram responsáveis por 27,6% das amostras positivas por qPCR, 92,6% desses indivíduos eram portadores assintomáticos da infecção, que provavelmente não seriam alvos da RCD. Tipagem molecular dos parasitos utilizando três marcadores polimórficos - *msp1F3*, *MS16* e *Pv3.27* revelaram alta diversidade de *P. vivax*, consistente com a complexidade das vias de transmissão e múltiplas fontes de infecção dentro dos aglomerados, potenciais complicações para os programas de eliminação de malária.

Palavras-chave: Malária. Busca Ativa Reativa. Amazônia.

ABSTRACT

Fontoura PS. Prospects for residual malaria elimination in rural Brazilian Amazon: Strategy of Reactive Case Detection for surveillance *Plasmodium vivax* in reservoir hosts. [Ph.D thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2016.

Malaria burden in Brazil has reached its lowest levels in 35 years and *Plasmodium vivax* now accounts for 85% of cases countrywide. The epidemiological surveillance residual malaria transmission entrenched in the Amazon is the next major challenge for ongoing elimination efforts. This situation prompted us to evaluate a strategy for targeted detection of parasite carriers (either symptomatic or asymptomatic) in areas approaching malaria elimination. We hypothesize that repeated screening of households (HHs) with one or more slide-confirmed clinical vivax malaria cases diagnosed by routine passive surveillance (referred to as index cases) and their neighbors is more cost-effective for finding new malaria infections than population-wide mass blood surveys. To test this hypothesis, we recruited 41 index cases (24 subjects classified with indigenous, 11 possible relapsing and 6 cases imported) 163 index household members (subjects sharing the household with index cases), 878 neighbors (subjects living within a radius of up to 3 km from index cases) and 841 controls (subjects living in the same locality, but > 5 km from the index case) between January and July 2013. Study participants lived in rural communities surrounding Acrelândia town, where *P. vivax* is the only malaria parasite diagnosed in humans. They were invited to contribute finger-prick blood samples, for laboratory diagnosis of malaria, at the time of index case diagnosis (day 0) and 30, 60, and 180 days later. Overall, 6,028 microscopical analysis revealed an increased prevalence of infection in index households (6.1%; odds ratio [OR] = 36.3, $P < 0.001$) and neighbors (2.6%; OR = 13.6, $P < 0.001$) compared to controls (0.1%). There were no positive cases for *P. falciparum*. Subjects in index and neighbor households were significantly more likely to be parasitemic than control households members, after adjusting for potential confounders (mixed-effects logistic regression models), and together harbored > 90% of the *P. vivax* biomass in study subjects. Four rounds of microscopy-based RCD would identify only 49.5% of the infections diagnosed by qPCR, but 76.8% of the total parasite biomass circulating in the proximity of index HHs. However, control HHs accounted for 27.6% of qPCR-positive samples, 92.6% of them from asymptomatic

carriers who were beyond the reach of RCD. Molecular genotyping analysis of parasites with three polymorphic molecular markers (*msp1F3*, *MS16*, and *Pv3.27*) revealed high *P. vivax* diversity, consistent with complex transmission networks and multiple sources of infection within clusters, potentially complicating malaria elimination efforts.

Key-words: Malaria. Reactive Case Detection. Amazon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo biológico da malária humana.....	32
Figura 2 -	Alterações na incidência de malária no mundo, 2000 a 2015.....	35
Figura 3 -	Populações sob risco de infecção por malária no mundo, 2014.....	36
Figura 4 -	Número de casos estimados de malária em diferentes regiões entre os anos de 2000 a 2015.....	37
Figura 5 -	Redução percentual da taxa de mortalidade por malária por diferentes regiões entre os anos de 2000 a 2015.....	38
Figura 6 -	Regiões afetadas pela malária.....	43
Figura 7 -	Número total de casos positivos de malária e por diferentes espécies (1990-2015), Brasil.....	46
Figura 8 -	Ciclo epidemiológico da malária humana.....	48
Figura 9 -	Classificação das áreas em diferentes regiões do Brasil, de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA), 2014.....	51
Figura 10 -	Municípios com alta transmissão de malária em 1985.....	54
Figura 11 -	Casos de malária notificados por estado e percentual (%) de participação no total de casos notificados na região Amazônica, 2015.....	56
Figura 12 -	Evolução temporal no número de casos notificados de malária no Brasil em comparação com o estado do Acre, entre os anos de 2009-2015.....	57
Figura 13 -	Localização dos municípios do estado do Acre.....	58
Figura 14 -	Panorama da malária no estado do Acre (2003-2013), segundo o Índice Parasitário Anual (IPA).....	59
Figura 15 -	Distribuição heterogênea em relação a notificação de casos de malária no estado do Acre (2009-2015).....	60
Figura 16 -	Manuscrito de Sir Ronald Ross descrevendo sua descoberta acerca do mosquito na transmissão da malária, 20 de agosto de 1897.....	62
Figura 17 -	Áreas infestadas pelo <i>Anopheles gambiae</i> (atualmente identificado como <i>An. arabiensis</i>) na região Nordeste do Brasil, 1960.....	72
Figura 18 -	Regiões afetadas por casos de malária no Brasil, 1960 e 2014.....	73
Figura 19 -	Casos de malária reportados no Brasil entre os anos de 1959-2014.....	75
Figura 20 -	Tendência do número de internações e mortes causadas por malária no Brasil (2000-2014).....	75
Figura 21 -	Contribuição de estados e municípios em relação à infecção por <i>Plasmodium falciparum</i> no Brasil, 2014.....	76
Figura 22 -	Panorama atual da malária falciparum no Brasil (a) e, (b) cenário proposto para o ano de 2019.....	76
Figura 23 -	Medidas a serem adotadas após a suspeita de um caso.....	79

Figura 24 -	Procedimentos adotados pelos órgãos locais de vigilância em endemias mediante a identificação de um caso positivo de malária.....	80
Figura 25 -	Classificação dos países em relação a malária.....	82
Figura 26 -	Mapa epidemiológico da malária vivax no Brasil.....	88
Figura 27 -	Mapa do cenário de eliminação do <i>P. falciparum</i> no Brasil.....	89
Figura 28 -	Fase dos municípios em relação ao <i>Plasmodium vivax</i> , Brasil.....	90
Figura 29 -	Plano estratégico de eliminação do <i>Plasmodium falciparum</i> no Brasil (2014-2019).....	91
Figura 30 -	Número estimado de infecções por <i>Plasmodium vivax</i> em diferentes países, 2013.....	94
Figura 31 -	Tendência de casos de <i>Plasmodium vivax</i> entre o período de 2000 – 2013.....	95
Figura 32 -	Porcentagem de casos de infecção por <i>Plasmodium vivax</i> e os respectivos estágios dos programas de países em regiões extra África-subsaariana, 2013.....	96
Figura 33 -	Número de casos de <i>Plasmodium falciparum</i> (2015) no Haiti (a) e na República Dominicana (b). Exemplo de cooperação entre países no combate à malária de fronteira.....	123
Figura 34 -	Fontes de investimento financeiro no Brasil destinados ao combate da malária (1990-2014).....	124
Figura 35 -	Padrão da distribuição dos casos de malária no Estado de Tocantins - período de 2009 a 2015.....	128
Figura 36 -	Modelo de “iceberg” para a cadeia epidemiológica da malária, principalmente em áreas de baixa transmissão.....	135
Figura 37 -	Micro-epidemiologia da malária em localidades com distintos padrões de transmissão.....	137
Figura 38 -	Delineamento do estudo. Visitas no dia 0, 30, 60 e 180 dias após a visita inicial.....	150
Figura 39 -	Mapa mostrando a localização do município de Acrelândia, no estado do Acre.....	153
Figura 40 -	Principais atividades desenvolvidas no Município de Acrelândia, extremo leste do estado do Acre.....	154
Figura 41 -	Mapa (escala 1 / 150.000) mostrando a localização e a divisão de lotes para os ocupantes do PAE Porto Dias realizada pelo INCRA em uma área de 22.145 ha no Município de Acrelândia.....	157
Figura 42 -	Mapa (escala 1 / 150.000) mostrando a localização e a divisão de lotes entre os ocupantes do PDS Gleba Porto Luís realizada pelo INCRA em uma área de 25.000 ha no Município de Acrelândia, Acre.....	158
Figura 43 -	Mapa (escala 1 / 140.000) mostrando a localização e a divisão de lotes para os ocupantes do PDS Gleba Porto Luís realizada pelo INCRA em uma área de 9.900 ha no Município de Acrelândia.....	159
Figura 44 -	Visualização das áreas de assentamentos rurais participantes do estudo, 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	160

Figura 45 -	Frequência mensal de casos de malária vivax notificados para malária, 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	162
Figura 46 -	Casos positivos notificados para malária entre o período de 2009 a 2015, Município de Acrelândia, Acre.....	163
Figura 47 -	Número de casos índices (n = 41) em comparação aos casos elegíveis notificados com malária vivax, 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	164
Figura 48 -	Localização geográfica dos casos índices que desencadearam a RCD, 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	165
Figura 49 -	Localização dos diferentes tipos de domicílios participantes no estudo, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	166
Figura 50 -	Desenho epidemiológico do estudo, 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	170
Figura 51 -	Estratégia de Busca Ativa Reativa (RCD), 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	171
Figura 52 -	Coleta de sangue capilar para confecção da lâmina de gota espessa e cartão de FTA.....	172
Figura 53 -	Quantificação da carga parasitária sanguínea.....	175
Figura 54 -	Exemplo de curva-padrão, obtida em qPCR, utilizada para a quantificação de parasitemias de <i>Plasmodium vivax</i>	175
Figura 55 -	Classificação dos casos de malária pela origem da infecção, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	178
Figura 56 -	Padrões de transmissão dos genótipos de <i>P. vivax</i> dentro dos aglomerados identificados.....	179
Figura 57 -	Modelo conceitual de variáveis exploradas em nosso estudo, 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	184
Figura 58 -	Frequência de sintomas clínicos relatados nos últimos 7 dias anteriores aos seguimentos de RCD, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	194
Figura 59 -	Diagrama de Venn relatando a proporção de infecções por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticadas por diferentes métodos de diagnósticos durante a RCD, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	196
Figura 60 -	Idade média em anos (amplitude) de indivíduos com diagnóstico positivo para gota espessa e método molecular, em diferentes seguimentos, Acrelândia, Acre, 2013.....	197
Figura 61 -	Porcentagem de infecções por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticadas por microscopia de gota espessa, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	202
Figura 62 -	Porcentagem de infecções por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticadas por método molecular, segundo tipo de domicílios Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	204
Figura 63 -	Infecções por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticadas por diferentes métodos de diagnóstico, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	206

Figura 64 -	Diagrama de Venn relatando a proporção de infecções por <i>P. vivax</i> diagnosticadas por qPCR, ausência de sintomas e infecções subpatentes, durante as quatro RCD. Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	210
Figura 65 -	Proporção de infecções por <i>P. vivax</i> diagnosticadas por qPCR, ausência de sintomas e infecções subpatentes, segundo tipo de domicílios, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	211
Figura 66 -	Frequência de parasitos por microlitro de sangue de indivíduos participantes do estudo, segundo tipo de domicílio, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	217
Figura 67 -	Frequência de parasitos por microlitro de sangue de indivíduos participantes do estudo, de acordo com a presença ou ausência de sintomas clínicos, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	218
Figura 68 -	Frequência de <i>P. vivax</i> por microlitro de sangue de indivíduos participantes do estudo, de acordo com a característica da infecção, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	219
Figura 69 -	Frequência de parasitos por microlitro de sangue de indivíduos participantes do estudo, segundo a idade (anos), Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	220
Figura 70 -	Número de amostras de <i>P. vivax</i> tipadas em relação ao número de casos sintomáticos diagnosticados pelo Sistema de Vigilância local e os casos diagnosticados pela Busca Ativa Reativa (RCD), Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	238
Figura 71 -	Distribuição temporal de genótipos predominantes para <i>Plasmodium vivax</i> em indivíduos participantes do estudo, de acordo com o mês de participação no estudo, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	240
Figura 72 -	Genótipos únicos e compartilhados no foco # 3, localizado na Gleba Porto Luiz, Acrelândia, durante os quatro seguimentos de Busca Ativa Reativa, 2013.....	242
Figura 73 -	Genótipos únicos e compartilhados no caso # 4, localizado na Gleba Porto Luiz, Acrelândia, durante os quatro seguimentos de Busca Ativa Reativa, 2013.....	244
Figura 74 -	Genótipos únicos e compartilhados no caso # 9, localizado na Reserva Porto Dias (próximo à fronteira com a Bolívia), Acrelândia, durante os quatro seguimentos de Busca Ativa Reativa, 2013.....	246
Figura 75 -	Genótipos únicos e compartilhados no caso # 30, localizado na Gleba Porto Luiz, Acrelândia, durante os quatro seguimentos de Busca Ativa Reativa, 2013.....	248

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Objetivos, etapas e metas para a Estratégia Mundial para a Malária, 2016-2030.....	65
Tabela 2 -	Sistema de Vigilância em malária de acordo diferentes áreas de transmissão e fases de combate à malária.....	83
Tabela 3 -	Casos índices segundo suas respectivas áreas de assentamento e localidades* de moradia, Acrelândia, Acre, 2013.....	164
Tabela 4 -	Oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação de três marcadores genéticos específicos para <i>Plasmodium vivax</i>	181
Tabela 5 -	Características demográficas e ambientais dos participantes do estudo (n=1923), Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	188
Tabela 6 -	Características demográficas e ambientais - <i>visita inicial</i> , 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	190
Tabela 7 -	Características demográficas e ambientais - <i>visita 30 dias</i> , 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	191
Tabela 8 -	Características demográficas e ambientais da <i>visita de 60 dias</i> , 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	192
Tabela 9 -	Características demográficas e ambientais da <i>visita de 180 dias</i> , 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	193
Tabela 10 -	Infecção por <i>P. vivax</i> diagnosticada por microscopia de lâmina de gota espessa e diagnóstico molecular nos casos índices durante os diferentes seguimentos de RCD, Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	199
Tabela 11 -	Teste da diferença e teste de concordância entre os diferentes métodos de diagnósticos* para <i>P. vivax</i> , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	207
Tabela 12 -	Teste da diferença e teste de concordância entre os diferentes métodos de diagnósticos para <i>P. vivax</i> , visita inicial , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	207
Tabela 13 -	Teste da diferença e teste de concordância entre os diferentes métodos de diagnósticos para <i>P. vivax</i> , visita 30 dias , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	207
Tabela 14 -	Teste da diferença e teste de concordância entre os diferentes métodos de diagnósticos* para <i>P. vivax</i> , visita 60 dias , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	208
Tabela 15 -	Teste da diferença e teste de concordância entre os diferentes métodos de diagnósticos* para <i>P. vivax</i> , visita 180 dias , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	208
Tabela 16 -	Frequência relativa e absoluta de infecções sintomáticas e assintomáticas de <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticada por microscopia convencional em relação aos moradores dos diferentes tipos de domicílios participantes nos quatro seguimentos de Busca Ativa Reativa (RCD), 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	212
Tabela 17 -	Frequência relativa e absoluta de infecções sintomáticas e assintomáticas de <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticada por método molecular em relação aos moradores dos diferentes tipos de domicílios participantes nos quatro seguimentos de Busca Ativa Reativa (RCD), 2013, Município de Acrelândia, Acre.....	213

Tabela 18 -	Média geométrica (Intervalo de confiança – IC 95%) e carga parasitária da infecção por <i>Plasmodium vivax</i> , segundo a classificação dos domicílios, seguimentos e sintomas pregresso, 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	215
Tabela 19 -	Média geométrica (Intervalo de confiança – IC 95%) e carga parasitária total (parasitos/ μ l**) de <i>Plasmodium vivax</i> segundo tipo de domicílios, característica da infecção e sintomas pregressos, 2013. Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	216
Tabela 20 -	Análise multinível por regressão logística para infecção por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticado por microscopia de gota espessa, 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	223
Tabela 21 -	Análise multinível por regressão logística para infecção por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticado por método molecular, 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	224
Tabela 22 -	Análise multinível por regressão logística para infecção por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticado por microscopia de gota espessa – visita inicial , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	226
Tabela 23 -	Análise multinível por regressão logística para infecção por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticado por qPCR – visita inicial , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	227
Tabela 24 -	Análise multinível por regressão logística para infecção por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticado por microscopia de gota espessa – visita de 30 dias , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	230
Tabela 25 -	Análise multinível por regressão logística para infecção por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticado por diagnóstico molecular – visita de 30 dias , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	231
Tabela 26 -	Análise multinível por regressão logística para infecção por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticado por microscopia de gota espessa – visita de 60 dias , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	232
Tabela 27 -	Análise multinível por regressão logística para infecção por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticado por qPCR – visita de 60 dias , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	233
Tabela 28 -	Análise multinível por regressão logística para infecção por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticado por microscopia de gota espessa – visita de 180 dias , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	235
Tabela 29 -	Análise multinível por regressão logística para infecção por <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticado por qPCR – visita de 180 dias , 2013. Município de Acrelândia, Acre.....	236
Tabela 30 -	Distribuição dos seis genótipos mais comuns de <i>Plasmodium vivax</i> (responsáveis por 30,1% do total de infecções locais) segundo as áreas de assentamentos*. Município de Acrelândia, Acre, 2013.....	239
Tabela 31 -	Genótipos multilocus em infecções consecutivas de <i>Plasmodium vivax</i> diagnosticadas em 54 participantes do estudo durante os diferentes seguimentos da RCD, Acrelândia, Acre, 2013.....	250

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	-	Acre
ACD	-	Busca ativa de casos (do inglês, <i>Active Case Detection</i>)
ACS	-	Agentes comunitários de saúde
ACT	-	Terapia antimalárica combinada à base de artemisinina (do inglês, <i>artemisinina-based combination therapies</i>)
AL	-	Terapia antimalárica combinada com arteméter-lumefantrina
AM	-	Amazonas
AS-AQ	-	Terapia antimalárica combinada com artesunato-amodiaquina
ATCS	-	Atestado de Condição Sanitária
BID	-	Borrifação intradomiciliar (do inglês, <i>selective indoor spraying</i>)
CEM	-	Campanha de Erradicação da Malária
CLIP-PCR	-	do inglês, <i>capture and ligation probe-polymerase chain reaction</i>
CQ	-	Cloroquina
DARC	-	<i>Duffy antigen receptor for chemokines</i>
DBP	-	<i>Duffy binding protein</i>
DDT	-	Diclorodifeniltricloroetano
dG6PD	-	deficiência da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
ed.	-	Edição
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
FSP	-	Faculdade de Saúde Pública
FTA	-	<i>filter paper-based DNA extraction</i>
FUNASA	-	Fundação Nacional de Saúde
GPS	-	Sistema de posicionamento global
h	-	horas
IBAMA	-	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
HRM	-	Técnica de dissociação de alta resolução (do inglês, “High Resolution melting”)
IC95%	-	Intervalo de confiança de 95%
ICB	-	Instituto de Ciências Biomédicas
IDI	-	Índice de Desenvolvimento Infantil
IDH	-	Índice de Desenvolvimento Humano
IDH-M	-	Índice de Desenvolvimento Humano – Municipal
IgG	-	Imunoglobulina classe G
ILP	-	Índice de lâminas positivas
IMC	-	Infecção por Múltiplos Clones
IMC > 1	-	Multiple Clone Infections at > 1 <i>loci</i> (Infecção por Múltiplos Clones > 1 <i>loci</i>)
INCRA	-	Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
INPE	-	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
IPA	-	Índice Parasitário Anual
km	-	quilômetros
LAMP	-	(do inglês, <i>Loop mediated isothermal amplification</i>)
LAPM	-	Laudo de Avaliação do Potencial Malarígeno
MDA	-	Tratamento com antimalárico em massa (do inglês, <i>Mass Drug Administration</i>)
MILD	-	Mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração (do inglês, <i>long-lasting insecticide-treated bed nets</i>)
MO	-	Microscópio óptico
MS	-	Ministério da Saúde
MST	-	Microssatélite

MSAT	-	Monitoramento e tratamento em massa (<i>do inglês, mass screening and treatment</i>)
N	-	Tamanho amostral
n	-	Número de amostras
OMS	-	Organização Mundial de Saúde (<i>do inglês, World Health Organization</i>)
OR	-	<i>Odds Ratio</i>
PA	-	Projeto de Assentamento Federal
PAD	-	Projeto de Assentamento Dirigido
PAE	-	Projeto de Assentamento Agroextrativista
PAHO	-	Organização Pan-Americana de Saúde (<i>do inglês, Pan American Health Organization</i>)
pb	-	pares de bases
PCD	-	Busca passiva de casos (<i>do inglês, Passive Case Detection</i>)
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>do inglês, Polymerase Chain Reaction</i>)
PDS	-	Projeto de Desenvolvimento Sustentável
PNCM	-	Programa Nacional de Controle de Malária
PQ	-	Primaquina
PSF	-	Programa de Saúde da Família
qPCR	-	PCR quantitativo em tempo real (<i>Real Time quantitative PCR</i>)
RCD	-	Busca Ativa Reativa de casos (<i>do inglês, Reactive Case Detection</i>)
RDT	-	<i>Rapid Diagnostic Tests</i> (Teste Rápido)
RO	-	Rondônia
rpm	-	Rotação por minuto
rRNA	-	ácido ribonucleico ribossômico
SIVEP	-	Sistema Informatizado de vigilância epidemiológica
SNP	-	Polimorfismo de Base Única (<i>do inglês, Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SPVEA	-	Plano de Valorização Econômica da Amazônia
SUS	-	Sistema Único de Saúde
SVS	-	Secretaria de Vigilância em Saúde
UBS	-	Unidade Básica de Saúde
UFAC	-	Universidade Federal do Acre
USP	-	Universidade de São Paulo
WGA	-	Método de amplificação do DNA (<i>do inglês, whole-genome amplification</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

°	- grau
°C	- grau Celsius
min	- minuto
seg	- segundo
cm	- centímetro
g	- grama
g/L	- grama por litro
h	- hora
Kb	- quilobase
kg	- quilograma
km	- quilômetro
km ²	- quilômetro quadrado
m	- metro
Mb	- megabase
mg/L	- miligrama por litro
mL	- mililitro
mm	- milímetro
N	- normalidade
ng/μL	- nanograma por microlitro
<i>P</i>	- valor-p (probabilidade de significância)
R0	- Número reprodutivo básico
teste	- teste qui-quadrado
χ^2	
μg/L	- micrograma por litro
μg/mL	- micrograma por mililitro
μL	- microlitro
μM	- microMol
%	- porcentagem
>	- maior
≥	- maior ou igual
<	- menor
≤	- menor ou igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....	33
2.1.1 Malária no Brasil.....	44
2.1.1.1 <i>Contexto epidemiológico na Amazônia.....</i>	<i>46</i>
2.1.1.2 <i>Distribuição heterogênea da malária no Acre.....</i>	<i>53</i>
2.2 BASES CIENTÍFICAS PARA A ELIMINAÇÃO DA MALÁRIA.....	61
2.2.1 Controle da malária no Brasil.....	66
2.2.2 Definições e estratégias na vigilância de malária.....	77
2.2.3 Estágios no programa de combate à malária.....	80
2.2.4 Malária vivax: do controle à eliminação.....	92
2.2.4.1 <i>Biologia do Plasmodium vivax.....</i>	<i>97</i>
2.2.4.2 <i>Da infecção assintomática ao quadro de malária grave.....</i>	<i>102</i>
2.2.5 Pilares da Estratégia no combate à malária.....	104
2.2.5.1 <i>Técnicas de diagnósticos e tratamento.....</i>	<i>104</i>
2.2.5.1.1 Métodos convencionais.....	105
2.2.5.1.2 Técnicas alternativas de diagnóstico.....	107
2.2.5.1.3 Diversidade genética.....	109
2.2.5.1.4 Tratamento antimalárico.....	114
2.2.5.2 <i>Controle vetorial.....</i>	<i>116</i>
2.2.5.3 <i>Ação multisetorial.....</i>	<i>118</i>
2.2.6 Desafios e perspectivas na eliminação da malária.....	121
2.2.6.1 <i>Teoria convencional para a eliminação da malária.....</i>	<i>126</i>
2.2.6.2 <i>Vigilância (Estratégias) de controle e eliminação da malária.....</i>	<i>128</i>
2.3 DECRÉCIMO DA MALÁRIA NO BRASIL: O OBJETIVO DA ELIMINAÇÃO.....	139
2.3.1 Reservatórios naturais de malária vivax em assentamentos da Amazônia.....	143
2.3.2 Uma estratégia para direcionar a busca ativa reativa de casos (RCD).....	146
3 HIPÓTESES CENTRAIS DE INVESTIGAÇÃO.....	147
4 OBJETIVO.....	148
4.1 ESPECÍFICOS.....	148
5 MÉTODOS E DELINEAMENTO EPIDEMIOLÓGICO.....	149
5.1 ÁREA DE ESTUDO.....	151
5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	161
5.2.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	167
5.2.2 Identificação dos focos de transmissão e visitas de seguimento.....	168

5.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS.....	172
5.4 MEDIDAS DOS PARÂMETROS PRIMÁRIOS E DAS VARIÁVEIS DE CONFUSÃO.....	173
5.4.1 Definições clínicas e tratamento.....	176
5.4.2 Classificação dos casos confirmados.....	176
5.5 GENOTIPAGEM PARASITÁRIA.....	180
5.5.1 Marcadores polimórficos.....	180
5.6 ANÁLISES DOS DADOS.....	182
5.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	186
6 RESULTADOS.....	187
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	187
6.2 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA INFECÇÃO.....	195
6.2.1 Casos índices.....	198
6.2.2 Estratégia de Busca Ativa Reativa.....	200
6.2.2.1 Microscopia de gota espessa.....	200
6.2.2.2 Diagnóstico molecular.....	203
6.2.2.3 Proporção de infecções por <i>Plasmodium vivax</i> entre os diferentes métodos de diagnósticos.....	205
6.2.2.4 Tipo de domicílios, infecções assintomáticas e a carga parasitária.....	209
6.3 FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR <i>P. VIVAX</i>	221
6.4 GENOTIPAGEM PARASITÁRIA.....	237
6.4.1 Focos de transmissão.....	240
7 DISCUSSÃO.....	256
8 CONCLUSÃO.....	274
REFERÊNCIAS.....	275
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (MAIORES DE 18 ANOS).....	296
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (MENORES DE 18 ANOS).....	297
ANEXO C – QUESTIONÁRIO DOMICILIAR.....	298
ANEXO D – QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL (VISITA INICIAL).....	299
ANEXO E – QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL (SEGUIMENTOS).....	301
ANEXO F – <i>Artigo: Reactive Case Detection for Plasmodium vivax Malaria Elimination in Rural Amazonia</i>	302
APÊNDICE – REGISTRO FOTOGRÁFICO DAS ÁREAS ANALISADAS.....	325

1 INTRODUÇÃO

O presente projeto de doutorado foi elaborado de acordo com as normas da Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e apresentado sob a forma de tese. Esse material científico inicia-se com a introdução, revisão da literatura sob o tema proposto, justificativa, principais hipóteses de investigação e objetivos. Posteriormente apresenta-se os resultados, a discussão e as considerações finais em relação ao estudo. Na seção pós-texto, segue nos anexos os questionários aplicados na investigação epidemiológica. A execução do projeto de pesquisa contou com suporte financeiro de diferentes agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (auxílio nº2013/02764-8), *National Institute of Allergy and Infectious* (NAIDH), *National Institutes of Health* (NIH), Estados Unidos da América (U19 AI089681) e Ministério da Saúde do Brasil (796673/2013). O doutorando contou, durante o projeto de pesquisa, com uma bolsa de doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Pesquisa – CNPq. A equipe de profissionais que participou da execução desse projeto foi composta pelo orientador, médico e licenciado em História (Marcelo Urbano Ferreira, ICB/USP), Márcia C. Castro, estatística e docente do *Department of Global Health and Population, Harvard T. H. Chan School of Public Health*, Boston, MA, Estados Unidos da América, uma enfermeira (Bruna Farias Finco), um biomédico e aluno de pós-graduação (Pablo Secato Fontoura), um farmacêutico e técnico bolsista (Jaques Franco de Carvalho Junior) e uma técnica do laboratório e bióloga (Maria José Menezes).

Apesar de prevenível, tratável e de possuir cura, estimou-se para o ano de 2015, a ocorrência de cerca de 214 milhões de casos e cerca de 438 mil mortes por malária em todo o mundo (World Health Organization, 2015c). Atualmente ocorre transmissão da doença em 97 países, sendo que 26 desses alcançaram os estágios de pré-eliminação, eliminação ou prevenção da reintrodução da malária em seus territórios, além de quatro países possuírem o certificado de áreas livres de malária (WHO, 2015a).

No Brasil, a malária é um exemplo de endemia cujo controle teve sucesso apenas parcial (Barreto et al., 2011). A extensa migração para a Amazônia, nas últimas décadas do século 20, levou a uma explosão na incidência da malária na região, com 600 mil infecções confirmadas em 1995. A intensificação das ações de

controle, no final dos anos 1990, levou a uma redução de transmissão da malária mas, ainda assim, foram notificados cerca de 142 mil casos novos em 2015 no país – 99,9% dos quais na Amazônia (Sistema informatizado de vigilância epidemiológica, Secretaria de vigilância em saúde / Ministério da Saúde, 2016). O Brasil ainda é o país que mais contribui atualmente com casos de malária notificados nas Américas e no Caribe (Pan American Health Organization, 2016a), sendo a transmissão mais intensa em áreas de assentamentos agrícolas, atividades madeireira e garimpos. Cerca de 85% das infecções são causadas por *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), indicando que as dificuldades de controle desta espécie contribuem em grande medida para a manutenção de transmissão da malária na região amazônica. Esta espécie produz uma infecção potencialmente debilitante que, embora raramente fatal, afeta a qualidade de vida e a produtividade da população de áreas endêmicas. A ocorrência de recaídas decorrentes da reativação de estágios hepáticos dormentes é um importante obstáculo para o seu controle (Mueller et al., 2009). Mundialmente, cerca de 70% dos países que atualmente se encontram na fase de eliminação da malária em seus territórios possuem o *P. vivax* como a espécie responsável pela maior quantidade de casos (WHO, 2015b). As estratégias atuais de controle da malária no Brasil baseiam-se no diagnóstico precoce e tratamento de casos clínicos para reduzir a transmissão e morbidade, onde mais de 3000 postos de notificação espalhados pela Amazônia fornecem gratuitamente o diagnóstico microscópico e o tratamento de infecções confirmadas laboratorialmente. Entretanto, uma importante lacuna na agenda de pesquisa corresponde a estratégias eficazes para identificar e tratar reservatórios assintomáticos da infecção, especialmente em áreas com baixa incidência de malária, hoje candidatas a iniciar programas de eliminação da transmissão (WHO, 2012a). Quase todas as infecções maláricas no Brasil são identificadas através da busca ativa (ACD) ou busca passiva (PCD) de casos febris, que dependem da presença de febre para diagnosticá-las. Uma limitação séria da busca de casos febris é que as infecções assintomáticas (geralmente associadas com níveis muito baixos de parasitemia, frequentemente não detectadas pela microscopia convencional) deixam de ser diagnosticadas e tratadas (Coura et al., 2006; da Silva et al., 2010). Apesar de ainda existir um contínuo debate sobre qual a melhor estratégia para se derrotar a malária, faz-se necessário, para se eliminar a malária, mudanças nas estratégias de combate diretamente relacionadas com os métodos de diagnóstico, tratamento, profilaxia e controle vetorial. Diante do atual cenário da malária, foi

lançado o desafio de eliminação da doença em diversos países, incluindo o Brasil, que no ano de 2015 apresentou o plano estratégico para eliminação de malária no país. Entretanto, a escassez de evidências para apoiar as intervenções atuais no controle da malária é particularmente surpreendente no Brasil, um país com uma capacidade de pesquisa relativamente bem desenvolvida. Essa situação pede uma parceria mais sólida, entre pesquisadores e gestores, para enfrentar com eficácia os desafios do país nessa área. Assim, este projeto científico insere-se neste contexto de parceria entre a academia e as equipes de controle de malária em área de fronteira agrícola na região amazônica brasileira e permitiu avaliar uma estratégia para identificar potenciais reservatórios em áreas com transmissão residual de malária candidatas a eliminação da doença na Amazônia Ocidental do país.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A malária humana é uma doença sanguínea causada por protozoários, atualmente classificados no supergrupo Chromoalveolata, grupo Alveolata, subgrupo Apicomplexa e do gênero *Plasmodium* (Adl et al., 2005). Dentre as cinco espécies implicadas na transmissão do protozoário para o homem, exceto pelo padrão zoonótico do *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*) - parasito comum de primatas - as demais espécies são transmitidas entre dois hospedeiros: seres humanos e mosquitos. O *P. vivax*, principal espécie causadora de malária em países fora do continente africano, assim como o *Plasmodium ovale* (*P. ovale*), relativamente incomum em todos os continentes, possuem uma característica peculiar em relação a sua biologia com graves implicações no combate à infecção por essas espécies, são as formas parasitárias que permanecem latentes no fígado do hospedeiro (hipnozoítos), sendo estes responsáveis pelas recaídas da malária (Mueller et al., 2009). Recaída em malária é definida como a presença de formas assexuadas sanguíneas originadas de hipnozoítos presentes no hospedeiro (Battle et al., 2014; White, Imwong, 2012; WHO, 2016b). Em um ensaio clínico randomizado com crianças de cinco a 10 anos de idade em Papua Nova Guiné verificou-se que as recaídas foram responsáveis por quatro de cada cinco episódios de malária vivax e três infecções de cada cinco infecções por *P. ovale* nos indivíduos analisados (Robinson et al., 2015). Responsável por até 90% da malária no continente africano, o *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) atualmente possui baixa incidência nas Américas quando comparados ao *P. vivax* (PAHO, 2016a); entretanto é a espécie responsável pela maioria dos casos graves da doença, além de sua elevada letalidade nas regiões afetadas. Grupos mais vulneráveis ao quadro grave da doença, incluindo morte, particularmente em áreas de alta transmissão da doença, são as mulheres grávidas e crianças menores de cinco anos de idade. Nessas áreas de alta transmissão os indivíduos frequentemente expostos ao parasito e ao mosquito vetor adquirem significativa imunidade clínica com o passar dos anos, como consequência principalmente indivíduos adultos apresentam, em sua grande maioria, infecções assintomáticas ou com baixo espectro clínico (WHO, 2012a). O *Plasmodium malariae* (*P. malariae*) é a segunda espécie de maior ocorrência no continente africano e com baixa prevalência no Continente Americano (WHO, 2015a). Apesar da escassez de relatos sobre a infecção pelo *P. knowlesi*, no ano de 2014, na Malásia, país candidato à eliminação da malária, esta

antropozoonose foi responsável por cerca de 38% dos casos locais de malária (WHO, 2015a).

O ciclo biológico da doença envolve três estágios principais (**Figura 1**). O primeiro inicia-se quando o homem (hospedeiro vertebrado) se infecta ao ser picado por mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* (hospedeiro invertebrado) durante seu repasto sanguíneo. O inseto inocula esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro. Tais formas migram até o fígado por meio da corrente sanguínea ou linfática, onde são capturados por diversas células de Küpffer e invadem vários hepatócitos onde se inicia o ciclo assexuado (esquizogonia tecidual) do parasito produzindo os esquizontes, que darão origem a milhares de merozoítos. Este período de incubação do parasito varia conforme a espécie infectante, de forma geral com duração de 8 a 15 dias. A presença de formas parasitárias dormentes intra-hepáticas (hipnozoítos), em *P. vivax* e *P. ovale*, torna-se um fator relevante na manutenção da infecção e na transmissão da doença, sendo responsáveis pelas recaídas (semanas, meses ou anos após a infecção primária) da malária. Parte dos merozoítos que conseguem escapar do sistema imune do hospedeiro voltam a corrente sanguínea e infectam exclusivamente células sanguíneas anucleadas, os eritrócitos. Nessa segunda etapa existem diferenças entre as espécies implicadas na doença com consequências na sua vigência. O *P. vivax* invade preferencialmente reticulócitos, que representa menos de 2% do total de células sanguíneas circulantes no homem, o que pode ser umas das explicações para sua baixa parasitemia em sangue periférico de pacientes (em média, 20 a 50 mil parasitos por mm³ de sangue) quando comparado as altas cargas parasitárias atribuídas ao *P. falciparum* (até 500 mil parasitos por mm³ de sangue). Este por sua vez, infecta qualquer tipo de eritrócito, apesar de uma preferência por células com menor tempo de vida (Sattabongkot et al., 2004). A baixa carga parasitária de *P. vivax* é um dos pontos que dificultam o combate a essa espécie, pois em muitos casos não é possível a detecção de formas parasitárias sanguíneas no diagnóstico usualmente empregado, como a microscopia de gota espessa, para a identificação da infecção (Bousema, Drakeley, 2011). No interior das hemácias, os primeiros estágios sanguíneos são os trofozoítos que darão início a uma nova fase assexuada do ciclo do parasito – esquizogonia sanguínea – onde ocorre a formação de merozoítos que ao serem liberados na corrente sanguínea são responsáveis pela sintomatologia característica da malária humana, os acessos febris. Os intervalos entre os picos febris correspondem à duração da esquizogonia

sanguínea em cada espécie. Geralmente os sintomas tem início com calafrios, um mal-estar acompanhado de sudorese, cefaleia e dores musculares; em poucas horas instala-se uma febre alta no indivíduo infectado. Os paroxismos em *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. ovale*, em média ocorre a cada 48 horas (“febre terçã”) e a cada 72 h em *P. malariae* (“febre quartã”). Ainda de acordo com a intensidade dos sintomas apresentados podemos classificar os acessos palúdicos em benignos ou malignos. A periodicidade dos acessos febris tem uma implicação prática na identificação dos indivíduos infectados pelo plasmódio, já que grande parte dos serviços de saúde ainda baseiam na detecção – passiva ou ativa – dos casos febris. Se o paciente não for tratado adequadamente, complicações podem decorrer desse período toxêmico podendo a infecção evoluir para formas graves e complicadas da malária (temperatura > 41 °C, convulsão, anemia intensa, hemorragias e hipotensão arterial) dependendo da espécie de plasmódio, aumento da parasitemia e da resposta imunológica do hospedeiro. No sangue do paciente, os merozoítos podem infectar novas hemácias, transformando-se em trofozoítos e posteriormente em esquizontes dando continuidade ao ciclo sanguíneo ou, alternativamente, podem diferenciar-se em formas reprodutivas sexuada do parasito, os gametócitos, infectantes para o mosquito vetor. Outra fase do ciclo da malária é conhecida como esporogonia (duração média de 10 a 17 dias), um ciclo sexuado que ocorre no interior do inseto vetor. Inicia-se quando a fêmeas do mosquito, ao se alimentar se sangue de um indivíduo infectado, adquire as formas parasitárias sexuadas do plasmódio. Todas as formas sanguíneas do plasmódio são ingeridas pelo inseto vetor, e com exceção dos gametócitos, as demais são digeridas no estômago do mosquito. Resultantes de um processo de exflagelação, os gametócitos masculinos originam de 6 a 8 microgametas, enquanto os femininos transformam-se em macrogametas. Resultado da fusão entre microgametas e macrogametas, o zigoto transforma-se em oocineto, um estágio móvel que penetra na parede do estômago do mosquito. Em poucas horas, essa estrutura se modifica em oocisto que fica alojada entre o epitélio e a membrana basal, onde ocorre em seu interior a formação dos esporozoítos, que quando liberados migram para as glândulas salivares do inseto. A fêmea do mosquito anofelino infectada pelo plasmódio ao realizar o repasto sanguíneo inocula formas de esporozoítos que darão início a ciclo no homem (Ferreira, 2012; Rey, 2008).

Os vetores responsáveis pela transmissão do plasmódio são insetos da ordem Díptera, subordem Nematocera e do gênero *Anopheles*. Dentre as 400 espécies que

compõe o gênero *Anopheles*, apenas 60 destas podem transmitir o plasmódio aos seres humanos. Porém, menos da metade dessas espécies viáveis a transmitirem o protozoário tem implicação na transmissão da malária (WHO, 2013). Em relação a distribuição global dos vetores de malária, há um notório predomínio de *Anopheles gambiae* (*An. gambiae*) na África sub-Saariana e de *Anopheles darlingi* (*An. darlingi*) na América do Sul (Kiszewski et al., 2004), estando presente em praticamente todos os países latino americanos que relatam casos de malária em seus territórios (Sinka et al., 2010).

Figura 1 - Ciclo biológico da malária humana. Adaptado de WHO (2007)

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

Na última década houve grandes avanços em relação à malária em diversas áreas, como a pesquisa básica, gerando (novos) conhecimentos principalmente acerca do parasito e do mosquito vetor, e também os projetos de intervenção com o principal objetivo de se reduzir de forma significativa a morbidade e a mortalidade ocasionadas pela doença. Avanços tecnológicos relacionados as ferramentas de combate à malária, como novas técnicas de diagnóstico, controle vetorial pelo uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas e a borrifação domiciliar, além de novos esquemas de tratamento antimalárico (por exemplo, combinação à base de artemisinina) colaboraram de maneira significativa com a melhora nos indicadores da doença em nível mundial (WHO, 2016a). Apesar dos ganhos significativos no combate à doença, evidenciados principalmente pela redução significativa da incidência de casos (**Figura 2**) e pela redução em aproximadamente 50% da taxa de mortalidade a nível mundial, a malária ainda é classificada como um grave problema de saúde pública global. Em 2015, cerca de 214 milhões de novos casos de malária foram diagnosticados em todo mundo, com mais da metade da população mundial (aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas) vivendo em áreas de risco para se adquirir malária (**Figura 3**). Neste mesmo ano, a doença foi relatada como a causa de morte de 400 mil pessoas (WHO, 2015c).

A incidência da malária é diretamente influenciada por fatores políticos, econômicos, sociais, ecológicos e biológicos (Buss, Pelegrini Filho, 2007; Castro et al., 2006; Tauil, 2011) em uma escala micro e macro-epidemiológica em diversas regiões do mundo. Atualmente há pessoas vivendo em áreas de risco para malária em mais de 100 países (WHO, 2015a). Somente na América Latina, estima-se que 120 milhões de pessoas vivem sob o risco de contrair a doença, onde a maioria dos casos concentra-se em áreas da Amazônia (PAHO, 2016a) (**Figura 4**). O maior número de mortes ocasionadas pela doença ocorre na região da África sub-Saariana, especialmente em indivíduos menores de cinco anos de idade e gestantes. Suas causas e consequências estão diretamente relacionadas as desigualdades sociais e econômicas no mundo, gerando obstáculos para o desenvolvimento regional, morbidade em indivíduos expostos, especialmente crianças, consequentemente ocasionando sérios problemas nas localidades afetadas, além do não acesso, por

milhares de pessoas, à prevenção e ao tratamento da malária em todo mundo (WHO, 2015a).

A endemicidade da malária em uma determinada localidade pode ser classificada como estável (população exposta de forma contínua a uma taxa de inoculação constante), instável (população exposta contínua ou intermitentemente a taxas de inoculação flutuante) e epidêmica (forma extrema de malária instável onde uma população experimenta um aumento significativo nas taxas de transmissão) (MacDonald, 1957). Há uma outra forma de se classificar a endemicidade da malária de acordo com a presença de baço palpável (Índice Esplênico) em crianças de dois a 9 anos de idade (WHO¹, 1950 apud Coura et al., 2006); entretanto existe problemas ao aplicá-la nos dias atuais, devido ao maior acesso ao pronto diagnóstico e tratamento oportuno, evitando assim o desenvolvimento da esplenomegalia (Coura et al., 2006).

¹ World Health Organization Expert Committee on Malaria, report on the Third Session. Geneva: WHO; 1950. (Technical Report Series, no. 8)

Figura 2 - Alterações na incidência de malária no mundo, 2000 a 2015. Adaptado de WHO (2015a)

Figura 3 - Populações sob risco de infecção por malária no mundo, 2014. Adaptado de WHO (2015a)

Fonte: Adaptado - World Malaria Report (WHO, 2015)

Figura 4 - Número de casos estimados de malária em diferentes regiões entre os anos de 2000 a 2015. Adaptado de WHO (2015a)

* Não houve relatos de morte por malária nos anos analisados.

Figura 5 – Redução percentual da taxa de mortalidade por malária por diferentes regiões entre os anos de 2000 a 2015. Adaptado de WHO

Entre os anos de 1945 a 2010, 79 países eliminaram a malária de seus territórios, onde atualmente cerca de 95% permanecem como áreas livres da doença (Chiyaka et al., 2013). Mediante os esforços no controle da malária no mundo, houve nos últimos 15 anos um grande decréscimo no número de casos da doença em todo o mundo, como países conseguindo reduzir em > 90% o número de casos clínicos (WHO, 2015a). O atual quadro mundial da malária permite que cerca de 34 países adotem estratégias locais de eliminação da doença (Cortter et al., 2013).

Sub-regiões localizadas em diferentes continentes possuem distribuição heterogênea em relação ao número de casos (e mortes) por malária, além de diferentes estágios no combate à doença (**Figura 6**). No continente africano, cerca de 800 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para a malária, onde aproximadamente 88% dessa população reside em áreas de alto risco para a doença (incidência > 1 caso por mil habitantes), sendo o *P. falciparum* responsável por mais de 90% dos casos reportados nesse território. Na última década houve um aumento substancial nos investimentos financeiros destinados ao combate à doença (por exemplo, em países localizados na região oeste do continente houve um aumento de 104 milhões no ano de 2005 para 637 milhões de dólares americanos em 2014), aliado a ampliação nas intervenções no combate ao vetor e maior acesso da população ao diagnóstico e medicamentos por meio dos serviços públicos de saúde refletiram em uma diminuição na morbidade e mortalidade da malária na região (WHO, 2015a). Apesar de limitado em muitos países, recentes dados de monitoramento relatam alta resistência aos inseticidas, principalmente compostos à base de piretróides, além do DDT (diclorodifeniltricloroetano), em diversos países africanos (WHO et al., 2013). Em geral, a droga antimalárica de primeira escolha nesses países é a terapia combinada de artesunato-amodiaquina (AS–AQ) ou arteméter-lumefantrina (AL), sendo relatado menos de 10% de resistência pelo plasmódio a essa terapêutica. Entretanto, nestes países, há uma importante lacuna para se determinar a real situação da malária local devido principalmente à inconsistência na reportagem de casos, acesso aos serviços de saúde e mudanças na cobertura dos testes diagnósticos (Trape et al., 2014; WHO, 2015a). Modelos matemáticos estimam que a incidência de casos diminuiu, entre os anos de 2000 a 2015, em aproximadamente 75% em Gambia, Senegal e Guiné-Bissau, quatro países localizados ao leste a ao sul (Etiópia, Madagascar, Ruanda e Tanzânia), 50-75% em três países do oeste africano (Gana, Libéria e Mauritânia), quatro territórios localizados na África Central (Angola, Burundi, Congo e República

Democrática do Congo), Malawi, Moçambique, Sudão do Sul, Uganda e Zâmbia (países localizados ao leste a ao sul) e, uma queda de mais de 50% em diversos países deste continente. Atualmente, quatro países localizados ao sul do continente são áreas consideradas de baixa incidência da doença com forte característica sazonal de transmissão; Namíbia, Botsuana, África do Sul e Suazilândia são países com iniciativas direcionadas à eliminação da doença em seus respectivos territórios, além de Argélia e Cabo Verde, localizados na África Ocidental (WHO, 2016a).

Na região oriental do mediterrâneo, em 8 países, cerca de 276 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para malária. Afeganistão, Djibuti, Paquistão, Somália, Sudão e o Iêmen são considerados localidades de alta transmissão da doença. Não houve grandes avanços em relação à diminuição no número de casos da doença nos últimos anos nessa região (2 milhões em 2000 para 1,5 milhões em 2014); Sudão (72%) e Paquistão (19%) foram responsáveis por 91% dos casos nessa localidade e por mais de 90% dos casos de morte pela doença no ano de 2014. Dois países encontram-se em fase de eliminação da doença: República Islâmica do Irã (onde o *P. vivax* é a espécie predominante) e a Arábia Saudita. Desde o ano de 2000, sete países relataram um decréscimo de mais de 75% na incidência da malária. Há relatos de altas taxas de resistência a inseticidas utilizados em praticamente todos os países dessa região. Desde o ano de 2000, Afeganistão, Irã, Somália e o Sudão relataram resistência pelo mosquito vetor para as quatro classes de inseticidas utilizados rotineiramente (WHO, 2015a). Na região do sudeste asiático cerca de 1,3 bilhões de pessoas residem em 10 países endêmicos para a malária, sendo que 231 milhões estão sob alto risco para a infecção pelo plasmódio. No ano de 2000, 2,9 milhões de casos da doença foram reportados na região. Em 2014, cerca de 1,6 milhões de infectados foram notificados na região. Cerca de 96% dos casos de malária na região são decorrentes da Índia (70%), Indonésia (16%) e Myanmar (10%). Houve uma redução em 7 vezes no número de mortes na região entre os anos de 2000 (5482) a 2014 (812 mortes). Bangladesh, Butão, República Democrática Popular da Coreia, Nepal, Timor-Leste e Sri Lanka reportaram um decréscimo de mais de 75% no número de casos da doença entre os anos de 2000 a 2014. Dois países (República Democrática Popular da Coreia e o Butão) encontram-se na fase de pré-eliminação da doença e no Sri Lanka não houve relato de transmissão local da malária desde o final do ano de 2012, estando seu sistema de vigilância local na fase de prevenção da reintrodução da doença (WHO, 2015a).

Nas Américas, em 21 países e territórios há cerca de 20% da população vivendo sob o risco de infecção da doença (112 milhões de pessoas) com aproximadamente 20 milhões residindo em áreas de alto risco; nesta região encontra-se 8 dos 32 países em todo o mundo que adotaram medidas de eliminação da doença em seus territórios (PAHO, 2016a). O número de casos confirmados de malária diminuiu em cerca de três vezes entre os anos de 2000 (1,2 milhões) a 2014 (390 mil casos) nos países latino-americanos. No ano de 2014, Brasil (37%), Venezuela (37%) e Colômbia (17%) foram responsáveis por mais de dois terços dos casos de malária no território americano (WHO, 2015a). Nos últimos 15 anos houve um decréscimo de 75% na incidência de casos confirmados de malária em 15 países (Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Suriname, Argentina, Costa Rica e Paraguai); estes três últimos encontram-se em fase de eliminação da doença em seus territórios. Contrariamente, na Venezuela, houve um aumento de 41% na incidência de casos confirmados por microscopia entre os anos de 2000 a 2014. Em 2014, foram relatadas 79 mortes por malária em todo continente americano (Brasil foi responsável por mais da metade dos casos de morte); houve uma redução de 80% no número de mortes por malária nas Américas entre os anos de 2000 a 2014. Apesar do *P. falciparum* ser responsável por 100% dos casos na República Dominicana e Haiti, o *P. vivax* é responsável por mais de 70% dos casos da doença no território americano (WHO, 2015c). De maneira contrária ao que ocorreu no continente africano, houve uma queda em relação os investimentos financeiros voltados para o combate à malária (US\$ 190 milhões em 2005 para US\$ 151 milhões em 2014); em 2014, em 10 países que se encontram em fase de pré-eliminação ou eliminação da malária, 100% dos recursos financeiros destinados ao combate da malária foram decorrentes de investimento governamental (WHO, 2016a). Apesar de limitados, geralmente descritos em suas regiões de aplicação, dados evidenciam a resistência do mosquito vetor a diferentes classes de inseticidas em diversos países (WHO, 2015a).

Na região ocidental do pacífico, em 9 países, aproximadamente 730 milhões de pessoas estão sob risco de contrair malária, sendo que 30 milhões vivem em áreas de alta transmissão, como Papua Nova Guiné, Ilhas Salomão e Vanuatu. Na maioria dos países, *P. falciparum* e *P. vivax* coexistem e são as espécies mais prevalentes. Três países são responsáveis por mais de 85% dos casos de malária nessa região, sendo Papua Nova Guiné o que mais contribui com o número de casos (71%) e mortes

por malária (77%). China e a República da Coreia são países em fase de eliminação da doença. A Malásia encontra-se atualmente em fase de pré-eliminação da malária em seu território; algo incomum verificado nesse território foi a alta prevalência de infecção ocasionada por *P. knowlesi* (37% em relação ao total de casos confirmados) no ano de 2014 nessa área de baixa transmissão da doença (WHO, 2015c).

Figura 6 - Regiões afetadas pela malária. a. Região Africana; b. Região Oriental do Mediterrâneo; c. Região Européia; d. Região das Américas; e. Sudeste Asiático e; f. Região Ocidental do Pacífico. Adaptado de WHO (2015a)

Em paralelo à redução da incidência e mortalidade da doença, há uma predominância da espécie de *P. vivax* em relação ao *P. falciparum* na grande maioria dos países fora do continente Africano, podendo ser responsável por até 90% dos casos em seus territórios (WHO, 2015a).

Como consequência da expansão das intervenções contra a malária, 33 países notificaram menos de 1000 casos de malária em 2015, além da Europa, que não era uma localidade endêmica para malária, mas que possuía relatos de cerca de 90.000 casos da doença desde o ano de 1995, é a primeira região a ser declarada livre de malária. No mês de maio de 2015, em uma Assembleia da OMS foi firmado o compromisso de se eliminar a malária em ao menos 35 países; o “*Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030*” objetiva eliminar a malária – até 2020 – de ao menos 10 países, sendo 6 dos potenciais candidatos localizados no Continente Africano. O plano audacioso objetiva a redução em até 90% na taxa de mortalidade pela doença até o ano de 2030 (WHO, 2015a). O documento salienta a necessidade de esforços para se aumentar os investimentos em todas as intervenções, incluindo inovações em testes de diagnósticos e tratamento, vigilância e medidas preventivas da doença.

2.1.1 Malária no Brasil

Apesar de contribuir com cerca de 42% dos casos de malária na Américas Latina e no Caribe, o Brasil obteve um grande declínio de casos da doença (76,8%) entre os anos de 2000 a 2014 (PAHO, 2016a; WHO, 2015c). No ano de 2015, foram notificados 142.988 casos positivos (em 1.501.678 exames diagnósticos realizados), sendo que destes 99,9% ocorreram na região da Amazônia Legal brasileira; 41 mortes relatadas foram atribuídas a casos de malária (Brasil, 2016). Apesar de promissor, principalmente em relação ao declínio da incidência da doença (redução de 615 mil casos para cerca de 138 mil casos de malária entre os anos de 2000 a 2014), há evidências de que a malária continua sendo um problema de saúde pública em diversos estados, já que mais de 95% dos casos com microscopia positiva notificados foram classificados como sendo de transmissão local (autóctones). Além disso, a distribuição dos casos de malária é altamente focal, sendo a maioria concentrados na Amazônia brasileira. Cabe salientar que em apenas 37 (dos 808 municípios da região Amazônica), há o relato de 80% do total de diagnóstico positivo para o ano de 2013 (Pina-Costa et al., 2014), onde quatro dessas cidades estão localizadas no Estado do

Acre – Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Rodrigues Alves e Tarauacá (Reis et al., 2015). Embora a detecção ativa de casos de malária contribua com cerca da metade dos exames realizados, dois terços dos casos positivos foram identificados pelo método passivo de busca, dados que sugerem que grande parte dos indivíduos que buscam pelo diagnóstico de malária são grupos que possuem alguma sintomatologia clínica relacionada a infecção, principalmente febre. Em 2015, cerca de 85% dos casos de malária em todo país foram ocasionados por *P. vivax* (124.958), com 15.846 casos de *P. falciparum*, 788 casos de infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum*, 38 casos de *P. malariae* e, somente um caso atribuído ao *P. ovale* (Brasil, 2016). Um aumento anual da prevalência das infecções por *P. vivax* em relação ao *P. falciparum* vem se repetindo desde o início dos anos de 1990 (**Figura 7**). Dentre os fatores que contribuíram de forma significativa para a atual situação de redução no número de casos (e mortes) por malária falciparum no país podemos destacar uma maior acessibilidade ao diagnóstico, aliado a sua alta sensibilidade na detecção de formas sanguíneas de *P. falciparum* e a eficiência e eficácia do tratamento adotado. Nos dias atuais, a maioria dos casos de malária falciparum ainda ocorre em regiões de fronteira internacional, garimpos e áreas de difícil acesso (por exemplo, reservas indígenas) (Barbieri et al., 2007; Ferreira, Castro, 2016). Um dado preocupante no Brasil está na relação direta entre a malária e a pobreza no país (Buss, Pelegriini, 2007). Cerca de 86% dos casos de doença ocorrem em áreas rurais ou indígenas e, no total de municípios prioritários devido à baixa renda per capita e baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) – entre outros indicadores de pobreza, nos seis estados de maior transmissão de malária, cerca de 48% são também prioritários para malária (IPA ≥ 10) (Brasil, 2014).

A alta discrepância em relação ao número reportado de infecções por *P. malariae* no Brasil quando comparado aos casos de malária vivax e malária falciparum pode ser em decorrência de uma maior dificuldade de transmissão dessa espécie já que o parasito necessita de um período maior de desenvolvimento no mosquito vetor (Ferreira, 2012); outra possibilidade é a baixa precisão na especificidade do diagnóstico de rotina para o *P. malariae* (Deane, 1988). Diferentes estudos transversais realizados em localidades da Amazônia Legal, verificaram por meio de técnicas moleculares uma prevalência de 9 a 12% de infecções por *P. malariae* entre os pacientes em localidades no estado do Mato Grosso (Scopel et al., 2005) e em Rondônia (Cavasini et al., 2000).

Figura 7 - Número total de casos positivos de malária e por diferentes espécies (1990-2015), Brasil. Fonte: Brasil (2016)

2.1.1.1 Contexto epidemiológico na Amazônia

Desde o início da década de 1970 o aumento na incidência anual de casos na Amazônia brasileira está diretamente relacionado à migração expressiva de indivíduos para a região incentivados pela instalação em larga escala dos projetos de assentamentos agrícolas (Castro et al., 2006; Marques, 1987; Reis et al., 2015). Cerca de 99,9% da malária notificada no Brasil ocorre na região da Amazônia Legal brasileira. Ocupando uma área de aproximadamente 5.020.000 km² o que correspondente a cerca de 61% do território brasileiro, a Amazônia Legal foi criada inicialmente como área de atuação da Superintendência do Plano de Valorização Econômica da Amazônia (SPVEA), em 1953, com o objetivo de ocupação de desenvolvimento da região. Diante de sua vasta biodiversidade com as maiores reservas vegetais, minerais e hídricas do planeta, a região amazônica vem sofrendo intensas pressões humanas nos últimos séculos (Singer, Castro, 2001). Caracterizada por florestas densas e clima estável (quente e úmido) a região torna-se um habitat ideal para a proliferação de vetores de diversas doenças infecto-contagiosas, como a

malária (Confalonieri, 2005). Sua população, entretanto, corresponde a 12,3% do total de habitantes do Brasil (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012). As regiões do país que compõe a Amazônia Legal são a Norte (estados do Amapá, Amazonas, Acre, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), Centro-Oeste (estado do Mato Grosso) e municípios do Maranhão (a oeste do meridiano de 44 ° de longitude oeste), estado pertencente a região Nordeste do país (IBGE, 2015). Dados relativos ao censo do ano de 2010 apontam que cerca de 24,9 milhões de pessoas vivem nessa área, além de 60% desses indivíduos não possuem acesso a condições sanitárias básicas e a água tratada (IBGE, 2012). Cada estado da Região Amazônica possui características próprias em relação à malária, principalmente decorrente da sazonalidade relacionada a precipitação, níveis de água e a temperatura; de forma geral, há um pico sazonal de casos de malária no período de transição entre as estações seca e úmida (Vitor-Silva et al., 2016). Além das variações climáticas, fatores socioambientais e a qualidade e quantidade de intervenções no controle da doença influenciam diretamente no número de casos em cada estado (Confalonieri, 2005; Castro et al., 2007; da Silva-Nunes et al., 2012) (**Figura 8**). Além dos fatores ecológicos, a alta densidade de mosquitos vetores, especialmente por *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, influência de forma positiva a incidência de malária na região (Ferreira, Castro, 2016; Moitinho et al, 2011; Pimenta et al., 2015).

Figura 8 - Ciclo epidemiológico da malária humana. Adaptado de Castro e Singer (2011).

A compreensão de dois conceitos epidemiológicos da malária - receptividade e vulnerabilidade – são fundamentais para o planejamento das ações de combate à doença na região Amazônica. O primeiro refere-se às condições ideais para que ocorra transmissão, especificamente a existência de uma densidade mínima e a competência dos mosquitos vetores, já o segundo conceito está relacionada com a probabilidade de pessoas infectadas pelo protozoário oriundas de áreas endêmicas migrarem para outras localidades e assim, introduzirem o parasito (Cohen et al., 2010; da Silva-Nunes, 2008; Tauil, 2011). Regiões receptivas para malária fora da região Amazônica diminuíram consideravelmente nos últimos anos, principalmente devido ao grande desmatamento consequentemente diminuindo o número de criadouros para o mosquito vetor (Tauil, 2011). A malária extra-Amazônica, em sua grande maioria está associada aos casos importados da doença pertencentes à área endêmica, outros países amazônicos, continente africano e do Paraguai; entretanto ainda existem focos de malária residual em outros estados com áreas de Mata Atlântica, como São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Boulos et al., 1991; Pina-Costa et al., 2014). Característica importante na epidemiologia da doença reside no fato de que a mortalidade pela doença na região amazônica é baixa (2/100.000 habitantes) quando comparada ao restante do país que pode atingir índices 100 vezes maior. A falta de informação aliada a dificuldade no diagnóstico e tratamento das pessoas infectadas

nessas áreas são os fatores determinantes para o panorama da doença fora de áreas endêmicas (Deane, 1988; Ferreira, Castro, 2016; Tauil, 2011).

Apesar de contemplada com os diferentes programas governamentais de combate à malária as particularidades ambientais, demográficas e econômicas foram as principais causas de insucesso das tratativas do governo, comparado as outras regiões do país, em solucionar o problema da malária na região Amazônica (Ferreira, Castro, 2016; Ladislau et al., 2006). Alguns itens foram cruciais para que os programas implementados, na época gerenciada pela SUCAM, não obtivessem os resultados esperados. Dentre estes se destacam o favorecimento da proliferação dos vetores do gênero *Anopheles* (presença de floresta tropical úmida), a dificuldade na aplicação do inseticida de ação residual (habitações precárias muitas vezes com ausência de superfícies para borrifação), o contato com estes vetores de indivíduos migrantes de outras regiões (sem imunidade adquirida ao plasmódio), inexistência de infraestrutura local permanente nas áreas de saúde e social, além da alta incidência de *P. falciparum* resistente à cloroquina (CQ), antimalárico de uso rotineiro no campo (Loiola et al., 2012; Tauil, 2011). Diante do aumento no número de casos de malária na região Norte e de evidências da ineficácia da estratégia de combate à doença que fora adotada para a Campanha de Erradicação da Malária (CEM) - que se propunha a erradicar a malária no país – baseada principalmente na aplicação intradomiciliar do inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT), houve a tentativa pelo órgão responsável – SUCAM – de diferentes estratégias no combate à doença. Ao fim dos anos 80, o sanitarista Agostinho Cruz Marques publicou um importante artigo científico sobre a importância da migração humana (suas características e consequências) e a disseminação e dificuldade de controle da malária na região Amazônica Brasileira (Marques, 1987). Atraídos pelas possibilidades das atividades comerciais, especialmente pela aquisição de novas áreas agrícolas e assentamentos, áreas de mineração (garimpos), além da exploração da floresta (atividade madeireira) indivíduos de diferentes regiões do Brasil migraram rumo a região Amazônica promovendo um grande aumento populacional principalmente durante a década dos anos 80 naqueles Estados, onde dentro de um curto período de quatro anos praticamente havia o dobro de indivíduos que compunham a população do Estado de Rondônia (570 mil para 1.040 mil pessoas), além de um aumento de aproximadamente sete vezes o número de indivíduos participantes dos programas de

assentamento agrícola no Estado do Acre (5 mil em 1981 para 34 mil em 1985) (da Silva-Nunes, 2008).

A classificação das áreas de acordo com o risco de se contrair a doença é medida, segundo o Ministério da Saúde, pelo Índice Parasitário Anual (IPA), que serve para classificar as áreas de transmissão – de acordo com o número de casos por mil habitantes - em alto (≥ 50), médio (< 50 e ≥ 10) e baixo risco (< 10) (**Figura 9**).

Figura 9 - Classificação das áreas em diferentes regiões do Brasil, de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA), 2014. Adaptado de Brasil (2015b)

Desde a década de 1970, o Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA) vem criando assentamentos rurais na Amazônia (Castro, Singer, 2011). Os assentamentos rurais são basicamente um conjunto de unidades agrícolas independentes entre si, instaladas pelo INCRA onde originalmente existia um imóvel rural que pertencia a um único proprietário. Chamadas de parcelas, lotes ou glebas, cada uma dessas unidades é entregue pelo órgão a uma família que esteja de acordo com especificações para receber o benefício. A geografia do terreno aliada as condições de produção do local é que irão determinar o tamanho e a localização de

cada lote. O governo federal se compromete a disponibilizar aos contemplados créditos, assistência técnica, infraestrutura e outros benefícios de apoio ao desenvolvimento familiar. As famílias assentadas deverão se comprometer a explorá-lo para o seu sustento, utilizando exclusivamente a mão de obra familiar. No Brasil, existem 9.337 assentamentos oficiais, com aproximadamente 977 mil famílias assentadas, distribuídos em praticamente todas as regiões da federação. Dados atuais indicam que existem cerca de 382 assentamentos oficiais na região da Amazônia Ocidental Brasileira (estados do Acre e Rondônia, com 161 e 221 assentamentos, respectivamente) (Brasil, 2015a). Nessa parte ocidental da Amazônia Legal, a migração é originária principalmente das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, enquanto que a migração da Amazônia Oriental, é proveniente, em sua grande maioria, do nordeste brasileiro (Marques, 1987). No Acre, em uma área territorial de 5.603.540 km², existem 161 assentamentos rurais abrigando cerca de 32.900 famílias. Sabe-se que importantes alterações ambientais, econômicas e sociais na Amazônia decorrem não somente da política de expansão das fronteiras agrícolas na região, mas também de áreas de mineração legal e mineradores informais, que constituem uma importante fonte de transmissão da malária na região (Barbieri, Sawyer, 2007; Coura et al., 2006;). Pelo menos cinco tipos de população possuem características distintas, decorrentes da heterogeneidade social, ambiental e econômica da região além de diferentes graus de antropização em seu território (Canfalonieri, 2005):

- a) Populações de núcleos urbanos, geralmente localizadas nas capitais dos estados (e algumas cidades de importância econômica regional);
- b) população indígena ou nativa;
- c) população de ribeirinhos;
- d) população de assentamentos agrícolas e de comunidades oriundas de assentamentos rurais;
- e) população de garimpos e ou projetos de mineração, caracterizada como população transiente.

Em consequência das diferenças geográficas, comportamentais e biológicas a que essas populações estão expostas, há explícita diferença em relação a epidemiologia da malária além de seus diferentes fatores associados (Castro et al., 2007; da Silva-Nunes, 2008; da Silva et al., 2010).

2.1.1.2 Distribuição heterogênea da malária no Acre

No estado do Acre, no início dos anos de 1980 – começo do processo migratório para aquela região, foram notificadas 6.000 lâminas positivas em todo estado, chegando a cerca de 36 mil casos de malária confirmados no ano de 1995, ocorrendo um recrudescimento significativo no ano de 1997 com 6.125 casos relatados. De forma semelhante ao ocorrido em toda a Amazônia brasileira, no ano de 1999, no estado do Acre, houve um aumento expressivo na incidência da doença com cerca de 23 mil casos diagnosticados (70% dos casos atribuídos ao *P. vivax*) (Brasil, 2000).

Em decorrência dos esforços do Plano de Intensificação de Ações de Combate à Malária (Brasil, 2000), implementado pelo governo federal no ano de 1999, houve um grande impacto positivo no Acre, com uma redução próxima a 75% na ocorrência de malária no ano de 2000. No ano de 2001, 55% dos casos de malária no Acre ocorreram em áreas de assentamento rural. Entretanto, o município de Acrelândia, localizado no extremo leste do estado (região do Baixo Acre) para o ano de 2001 manteve-se como um município classificado de alto risco; cerca de 80% dos casos relatados no município localizaram-se na zona rural, onde há vários projetos de assentamento do INCRA (Figura 10). Neste mesmo período o IPA do município foi de 104,3 (FNS/MS², 2002 apud Costa, 2003). Atualmente, Acrelândia é considerada uma área de malária residual, ou seja, hoje uma queda drástica no número de casos da doença nos últimos 10 anos; no ano de 2015 foram notificados no município 54 positivos para malária (não houve malária falciparum) e seu IPA para o mesmo ano foi de 2,3; desde o ano de 2010, o município não registrou nenhum caso autóctone de malária ocasionada por *P. falciparum* (Brasil, 2015b).

² Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Sistema de informação do programa de controle de malária (SISMAL). Relatório resumo epidemiológico, 2001. Brasília: FNS/MS; 2002.

Figura 10 - Municípios com alta transmissão de malária em 1985. **b.** Áreas de assentamentos agrícolas localizados na Amazônia Legal Brasileira mais acometidos pela malária no ano de 1985. Observe (seta vermelha) que o Município de Acrelândia estava inserido em ambos os contextos. Adaptado de Marques (1986)

O Estado do Acre, no ano de 2015, foi responsável por cerca de 19% (27.221) da totalidade de casos de malária que ocorreram no mesmo ano na região da Amazônia Legal Brasileira (ou seja, 18,9% dos casos em todo o Brasil). O número de casos anuais da doença no Acre é inferior somente em relação ao estado do Amazonas, responsável por 52% das infecções maláricas no Brasil (**Figura 11**). A transmissão autóctone ainda continua a ser um problema de saúde pública na região, já que cerca de 95% dos casos notificados da doença são transmitidos localmente (Brasil, 2016). Apesar de uma discreta redução de 13% na incidência da malária no Acre comparando os anos de 2014 e 2015, os números de casos notificados anualmente praticamente não sofreram alterações nos últimos anos, contrariando a tendência nacional de redução de casos de malária (**Figura 12**). Com uma população de aproximadamente 735 mil habitantes (IBGE, 2010) e composto por 22 municípios (**Figura 13**), o Estado caracteriza-se especialmente na última década por uma distribuição heterogênea da incidência de malária em seu território. A região do Alto Acre (conhecida como Vale do Juruá) representada principalmente pelos municípios de Cruzeiro do Sul (78.507 habitantes), Mâncio Lima (15.206 habitantes) e Rodrigues

Alves (14.398 habitantes) (IBGE, 2010) é responsável por mais de 90% dos casos de malária notificados no Estado (Reis et al., 2015; Brasil, 2015b) (**Figura 14**). Essa região é onde se concentra praticamente a totalidade de casos de infecção por *P. falciparum* no Acre. Entretanto, nossa localidade de estudo – o município de Acrelândia, localizada na região do Baixo Acre além das localidades adjacentes – sofreu uma redução drástica nos casos da doença nos últimos 10 anos (Barbosa et al., 2015; da Silva-Nunes et al. 2009; da Silva et al., 2012; Brasil, 2016). Acrelândia é típico exemplo de fronteira agrícola sendo comum o fluxo migratório de indivíduos de outras regiões do país e até por imigrantes oriundos principalmente da Bolívia (divisa ao sul) e Peru (países que faz divisa territorial ao oeste e ao norte). Nos últimos anos, o município foi palco de disputas por terras. Assim, o aumento esporádico do número de casos de malária nessa área não é raro devido principalmente a possível introdução de casos importados no município. Apesar de uma redução de 29% do número de casos de malária em áreas de assentamentos rurais de janeiro do ano de 2014 a dezembro de 2015 (Brasil, 2016), essas são áreas de extrema importância na transmissão da malária no estado (Barbosa et al., 2015; Castro, Singer, 2011; da Silva-Nunes et al., 2009; da Silva et al., 2010; Lima et al., 2012).

Figura 11 - Casos de malária notificados por estado e percentual (%) de participação no total de casos notificados na região Amazônica, 2015.
Fonte: Brasil (2016)

Figura 12 - Evolução temporal no número de casos notificados de malária no Brasil em comparação com o estado do Acre, entre os anos de 2009-2015.
Fonte: Brasil (2016)

Figura 13 - Localização dos municípios do estado do Acre, Brasil.

Figura 14 - Panorama da malária no estado do Acre (2003-2013), segundo o Índice Parasitário Anual (IPA). (IPA = 0, não há casos reportados; Baixo IPA, < 10 casos/1000 hab; Médio IPA, ≥ 10 casos/1000 hab; Alto IPA ≥ 50 casos/1000 hab). Adaptado de Reis et al. (2015)

Figura 15. Distribuição heterogênea em relação a notificação de casos de malária no estado do Acre (2009-2015). Fonte: Brasil (2015b)

2.2 BASES CIENTÍFICAS PARA A ELIMINAÇÃO DA MALÁRIA

“Like chess, (malaria) is played with a few pieces, but is capable of an infinite variety of situations” (Lewis Wendel Hackett, 1937).

A malária é uma das causas mais antigas causas de morbidade e mortalidade no homem. Os esforços no controle da doença tiveram início no final do século XIX. Descobertas científicas a partir do final dos anos de 1890 impulsionaram e nortearam as principais medidas de combate à malária. Como alguns exemplos podemos atribuir a descoberta, feita por Ronald Ross em 1898 (**Figura 16**), da transmissão da malária de aves ocasionada pela picada do mosquito e a descoberta, por Grassi e colaboradores em 1899, do gênero *Anopheles* como vetores da malária humana (Deane, 1988; Farid, 1980). No início do século XX, implicações demográficas e ambientais acerca da doença foram descritas por meio da observação de Carlos Chagas (1905), atribuindo a infecção pelo parasito em domicílios (transmissão intradomiciliar), além das questões sanitárias propostas por Watson e Swellengrebel (1910). A descoberta das propriedades do inseticida DDT no combate ao inseto vetor e da CQ em meados da década de 1930 (Andersag, 1934) foram as principais ferramentas responsáveis pelo declínio da doença em todo o mundo (Tauil, 2011). Não distante da realidade atual, os esforços para o combate da malária tiveram como alvos primários (e principais), o combate ao mosquito vetor, onde incluiu desde questões sanitárias e ambientais relacionadas ao ciclo biológico e o trabalho desenvolvido pelo homem, até o uso em larga escala do inseticida DDT, aliado ao tratamento dos indivíduos infectados pela doença (Deane, 1988; Farid, 1980; Ferreira, Castro, 2016; WHO, 2013).

Figura 16. Manuscrito de *Sir Ronald Ross* descrevendo sua descoberta acerca do mosquito na transmissão da malária, 20 de agosto de 1897.
 Fonte: London School of Hygiene and Tropical Medicine (2014)

Dentre os principais programas de controle implementados desde o início do século XX podemos destacar o Programa de Controle da Malária nos Estados Federados Malaio, em inglês *Federated Malay States*, (1901-1921) onde foi priorizando o combate ao vetor tendo como base as intervenções ambientais como drenagem das áreas alagadas. Outro importante programa foi o de controle da malária no Canal de Panamá (1905-1910). Diferentes estratégias integradas foram implementadas durante essa importante construção civil, como a drenagem das áreas, o uso de larvicida e de inseticida no combate ao inseto vetor, além do tratamento profilático das pessoas a base de quinina e o monitoramento dos domicílios presentes na área. Um plano ambicioso de erradicação mundial da malária foi lançado pela OMS em 1955 - com duração até o ano de 1972, *Global Malaria Eradication Programme* (GMEP) onde os esforços se concentraram no uso profilático e terapêutico da CQ e na administração do inseticida DDT no controle vetorial. Apesar

das significativas conquistas – 15 países e 1 território eliminaram a malária e, diversos países diminuíram de forma significativa o número de casos da doença – o mesmo sucesso não se observou na região da África sub-Saariana, e em muitos locais, devido a descontinuidade do programa, houve o ressurgimento de casos de malária. Diminuição dos investimentos em programas de combate à malária, agravados pela crise econômica mundial do início da década de 1970, aliados a resistência do mosquito vetor ao inseticida DDT e a resistência do parasito a CQ relatados em muitas localidades, promoveram um aumento significativo no número de casos mundial da doença nas duas décadas seguintes (WHO, 2012b). Diante do agravamento da situação em todo o mundo, no ano de 1992, a OMS juntamente com profissionais da saúde em todo o mundo elaboraram uma nova estratégia de combate à malária – *WHO Global Malaria Control Strategy*. Apesar de tímida, houveram alguns avanços em relação a redução da morbidade e mortalidade relacionados à doença nesse período em diversas localidades, porém país conseguiu eliminar a malária em seu território. Em uma conferência realizada na cidade de Dakar, Senegal, no ano de 1997, diversos cientistas e organizações de financiamento se reuniram, discutiram e identificaram quais as prioridades de pesquisas científicas que deveriam ser adotadas na área. Como consequência, aumentou-se o investimento na área de pesquisa com notórios avanços em diversas áreas, especialmente nas áreas de medidas eficazes de controle da doença, como o teste de diagnóstico rápido (em inglês, *rapid diagnostic tests* – RDTs), desenvolvimento de mosquiteiros impregnados com inseticida de maior duração e, as terapias antimalárica combinadas baseadas na droga artemisinina (em inglês, *artemisinina-based combination therapies*, ACTs). No ano seguinte, em um ato conjunto envolvendo a OMS, organizações governamentais e privadas (algumas delas de financiamento) foi criada a iniciativa *Roll Back Malaria* onde a principal meta era a de reduzir pela metade a incidência de malária em todo mundo até o ano de 2010. Em paralelo, visando reduzir a mortalidade por malária em até 50% no continente africano, líderes de países endêmicos para a doença assinaram a Declaração de Abuja a partir do *Roll Back Malaria* naquele continente (WHO, 2012a). Assim, diversas conquistas em relação ao combate da malária podem ser explicitadas. Entre os anos de 2005 a 2014, com a criação do Fundo Global no Combate a AIDS, Tuberculose e a Malária, praticamente aumentou-se em três vezes o investimento financeiro (de 900 milhões para 2,5 bilhões de dólares americanos) anual em medidas de controle da doença no mundo. Em decorrência, entre os anos de 2007 a 2015, cinco países

(Turquemenistão, República da Armênia, Ilhas Maldivas, Marrocos e Emirados Árabes Unidos) reduziram a zero o número de casos em seus respectivos territórios, além de mais 13 países, no ano de 2014, não reportarem nenhum caso autóctone de malária, dentre estes Costa Rica, na América Central e, Paraguai e a Argentina, situados na América do Sul. Entre os anos de 1955 a 2015, dois territórios e 27 países receberam da OMS o certificado de áreas onde a malária foi eliminada, sendo que atualmente países como a Argentina, o Quirguistão e o Sri Lanka iniciaram os seus respectivos programas de eliminação da doença. Os programas de controle da doença causaram um grande declínio nos casos novos de malária em todo o mundo. Entre os anos de 2000 a 2015, a incidência da doença diminuiu 37%, além de uma redução da mortalidade global em 60%. Nas regiões africanas onde se concentraram os esforços no combate à malária, taxa de mortalidade em todas as faixas etárias obteve uma redução de 66% e de 71% entre as crianças acima de cinco anos de idade (WHO, 2015a).

Durante a Assembleia Mundial de Saúde realizada em maio de 2015, a OMS promoveu um debate sobre o tema intitulado *Global Technical Strategy for Malaria 2016 – 2030*, fruto de um trabalho coletivo entre organizações governamentais e não governamentais envolvendo pesquisadores de mais de 70 países cujo objetivo central visa reduzir drasticamente a malária nos próximos 15 anos. Dentre os principais objetivos do programa destacam-se a redução da incidência de casos e de mortalidade pela doença em, no mínimo, 90%, eliminação da malária em aproximadamente 35 países, além da prevenção do ressurgimento da doença em países com áreas livres de malária (WHO, 2015a). Nos dias atuais países localizados no continente africano (Argélia, Botsuana, República de Cabo Verde, Camarões, África do Sul e Suazilândia), na Ásia (Butão, China, Malásia, Nepal, República da Coreia e Timor Leste), no Oriente Médio (Irã e Arábia Saudita), América Central (Belize, El Salvador e Costa Rica) e, na América do Sul (Suriname, Equador, Argentina e Paraguai) encontram-se em estágio de pré-eliminação da doença, com potencial para que não seja diagnosticado nenhum caso de malária adquirida localmente (autóctone) em pelo menos um ano. Com a adoção dessa nova estratégia espera-se que a malária seja eliminada, até 2020, em pelo menos 10 destes países candidatos, em pelo menos 20 países até o ano de 2025 e, em mais de 35 países até o ano de 2030 (**Tabela 1**) (WHO, 2016a). Todavia, a OMS alerta para o “longo caminho a percorrer”, já que nos dias atuais, cerca de mais da metade da população mundial

(aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas) vive em áreas de risco para se adquirir malária. No ano de 2015, a doença foi relatada como a causa de morte de 400 mil pessoas; no mesmo ano cerca de 214 milhões de novos casos de malária foram diagnosticados em todo mundo.

Tabela 1 - Objetivos, etapas e metas da Estratégia Mundial para a Malária, 2016-2030.

	2020	2025	2030
1. Reduzir as taxas de mortalidade por malária a nível mundial, em comparação com o ano de 2015.	Pelo menos em 40%	Pelo menos em 75%	Pelo menos 90%
2. Reduzir a incidência de casos de malária a nível mundial, em comparação com o ano de 2015.	Pelo menos em 40%	Pelo menos em 75%	Pelo menos 90%
3. Eliminar a malária nos países em que a doença foi transmitida no ano de 2015.	Pelo menos 10 países	Pelo menos 20 países	Pelo menos 35 países
4. Evitar o reestabelecimento da malária em todas as áreas livres de malária.	Prevenir o reestabelecimento	Reestabelecimento evitado	Reestabelecimento evitado

Adaptado de WHO (2015a)

2.2.1 Controle da malária no Brasil

Desde o início do século XX, a importância política, econômica e social da malária no Brasil desencadeou uma série de medidas governamentais visando o combate da doença em todo o território nacional. Ao longo dos anos levando em consideração os diferentes contextos político, demográfico e territorial que marcou o país, diferentes planos e ações foram elaboradas e executadas obtendo, em alguns casos, resultados satisfatórios (como redução do número dos casos), porém não suficientes para se eliminar a doença no país (Barreto et al., 2011; Ladislau et al., 2009; Rosen, 1980; Tauil, 2011).

No ano de 1905, o médico Carlos Chagas liderou a primeira campanha contra a malária no país durante a construção do porto na cidade de Santos, litoral do Estado de São Paulo. Devido a observação da endofilia dos mosquitos vetores, a principal medida de combate à doença utilizou-se de intervenções contra a forma adulta do mosquito vetor como instalação e telas nas janelas e a borrifação nas moradias. O número de casos da doença diminuiu drasticamente após um mês de intervenção e, não se observou novos episódios de malária após três meses (Chagas, 1934; Deane, 1986; Silveira, Rezende, 2001). Devido ao sucesso da campanha, o conceito de “transmissão domiciliar” (infecção adquirida principalmente no interior dos domicílios) foi difundido mundialmente e serviu de base para as intervenções por meio da borrifação intradomiciliar e o uso de mosquiteiros (Ferreira, Castro, 2016). A partir dos anos de 1920 as propostas de controle da malária eram programadas de acordo com as características ambientais das áreas endêmicas. Obras de drenagens e escoamentos de áreas alagadas (fonte de reprodução do mosquito vetor) foram alguns dos projetos de engenharia para o manejo ambiental que reduziu consideravelmente o número de casos de malária na região costeira do nordeste do Brasil (Deane, 1988; Neiva, 1940). Um valioso estudo produzido por Francis Metcalf Root no ano de 1926 na cidade do Rio de Janeiro descreveu a presença do subgênero *Nyssorhynchus* e a descrição do *An. darlingi* como a principal espécie implicada na transmissão da malária em grande parte do Brasil (Deane, 1988). Em 1930, na cidade de Natal, Rio Grande do Norte, foi descoberto pelo entomologista americano Raymond Shannon, a presença do mais competente mosquito vetor do continente africano, *Anopheles arabiensis* (primeiramente identificado como *An. gambiae*) que provavelmente foi introduzido no país por embarcações oriundas daquele continente

(Parmakelis et al., 2008) (**Figura 17**). Como consequência, em menos de um ano (1938-1939) existiam cerca de 150 mil casos da doença causando 14 mil mortes na região Nordeste do Brasil (Deane, 1988; Parmakelis et al., 2008). Uma grande operação de controle com aproximadamente 40.000 trabalhadores foi implementada na região e contou com recursos financeiros do governo federal (87%) e financiamento não governamental (*Rockefeller Foundation*) para um custo total de US\$ 1,8 bilhões de dólares. Borrifação domiciliar mensal com piretróide diluído em querosene, detecção e tratamento imediato dos casos com atrabine e quinino, a desinfecção com piretróides de carros e caminhões com passagem ou permanentes na área endêmica e a eliminação dos criadouros do mosquito com uso de larvicida químicos foram algumas das principais estratégias utilizadas durante os 18 meses da operação. Em 1940, o *An. arabiensis* foi eliminado do Brasil (Deane, 1988). O sucesso dessa campanha aliada ao êxito de uma estratégia similar utilizada no Egito (Farid, 1980) inspiraram a organização de estratégias de erradicação da doença pela OMS entre os anos de 1955 a 1969 (Lítsios, 1997).

No início dos anos 40, a malária estava presente em 70% (1390) dos municípios da federação (que na época contava com 1986 municípios), ou seja, 85% da superfície do país era endêmica para malária e aproximadamente 31 milhões de pessoas estavam expostas a doença, com 6 – 8 milhões de infectados com 80 mil mortes atribuídas à doença (Pina-Costa et al., 2014; Silva, Paiva, 2015). Diante desse quadro as campanhas de combate foram iniciadas a nível nacional. Em meados de década de 1940 em decorrência da introdução da CQ (em substituição ao Atrabine) como uma nova droga antimalárica e a utilização sistêmica do inseticida residual DDT, houve um impacto positivo na diminuição dos casos da doença no país - em 1957, havia cerca de 250 mil casos de malária para uma população nacional de 62 milhões de pessoas (Loiola et al., 2002; Silva, Paiva, 2015). Nesse mesmo período, um surto de malária ocorreu em São Paulo (no ano de 1941) com mais de 180 mil casos confirmados da doença (Deane et al., 1988). Assim como São Paulo, os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul enfrentavam um problema de saúde pública particular em relação à malária naquelas localidades. Foi atribuído que todos os casos da doença nessas localidades eram transmitidos por mosquitos do subgênero *Kertessia* (especialmente pelo *An. cruzi* e o *An. bellator*) que se reproduziam em bromélias. Assim, um grande e árduo esforço no combate à doença foi instalado nessas áreas, partindo-se principalmente de uma grande remoção de bromélias das áreas afetadas

(em 1950, cerca de 25 milhões de plantas tinham sido removida) e pelo uso do DDT. Houve um grande decréscimo no número de casos de malária nesses estados, de 40 mil casos/ano em 1940 para 4 a 5 mil na década de 1970 e, cerca de 71 casos no ano de 1982 (Deane, 1988) (**Figura 18**). Nos dias atuais, praticamente todos os Estados da região Sudeste e Sul são áreas livres de malária, exceto áreas que ainda apresentam casos importados da doença, em sua grande maioria em regiões de presença de Mata Atlântica (Ferreira, Castro, 2016).

Os esforços de combate à doença entre os anos de 1950 – 1970 em uma ação conjunta entre o governo federal, estaduais e municipais proporcionou resultados significativos na redução da malária no país. Em 1957, uma campanha de natureza vertical e exclusiva para o combate da malária foi criada no Brasil pelo Serviço Nacional de Malária - a Campanha de Erradicação da Malária (CEM) – onde as ações de combate visando a erradicação da doença se basearam na busca passiva e ativa de casos febris com a administração de drogas antimaláricas em seres humanos parasitados pelos plasmódios (especialmente o uso da CQ), além da aplicação intradomiciliar do DDT contra os anofelinos vetores da doença (Ferreira, Castro, 2016). Como ponto positivo do programa vale destacar a drástica redução no número de casos de malária em todo país (em torno de 50% das lâminas de gota espessa positiva entre 1965 e 1970), além de eliminar a malária em diversas regiões como o Nordeste, Centro-Oeste e Sul (no ano de 1979 essas áreas foram consideradas livres de transmissão autóctone de malária). Entretanto, a estrutura hierarquizada e de operacionalização vertical da CEM não obteve o mesmo sucesso na região da Amazônia Brasileira quando comparado a outras áreas do país com cobertura do programa. Diversos fatores são apontados como causadores do insucesso do programa nessa região. Vale destacar a importância na transmissão extradomiciliar na região fazendo com que o uso do inseticida de ação residual (DDT) não alcançasse o efeito desejado, além de sua aplicação correta ser limitada pelas condições de habitação naquelas localidades (Loiola et al., 2002; Tauil, 2011).

Paralelamente as recomendações da OMS, diversas propostas foram apresentadas como parte do esforço se eliminar a doença no país. No início da década de 1950, o médico sanitário Mario Pínotti apresentou uma medida, o método de Pínotti - que consistia em adicionar CQ ao sal de cozinhar (“sal cloroquinado”) - para ser utilizada tanto de modo complementar ao DDT quanto como a única estratégia profilática e terapêutica, quando o emprego do inseticida não fosse possível (Pínotti

et al.³, 1955 apud Ferreira, Castro et al., 2016; Silva, Hochman, 2011). Mais tarde essa estratégia também foi adotada por países como a Tanzânia (Clyde, 1966) e Guiana (Giglioli et al., 1967). Além do risco de se selecionar cepas resistentes à droga antimalárica (o que provavelmente ocorreu em relação a resistência à CQ pelo *P. falciparum*), alterações na cor e sabor dos produtos devido às condições de armazenamento dificultaram sua efetividade e o método foi abandonado (Deane, 1988; Giglioli et al., 1967; Silva, Hochman, 2011; Val et al., 2014). No ano de 1970, somente 52 mil casos da doença foram reportados para uma população de 92,3 milhões de habitantes, ou seja, 1% do número de casos estimados nos 20 anos anteriores (Deane, 1988). Entretanto, 73% dos casos eram atribuídos à região Amazônica do país onde se as condições ambientais, climáticas, tipos de moradias, além da dificuldade de acesso a diversas comunidades dificultavam a implementação de medidas no combate à doença naquela região. Com a intensa migração humana para a região amazônica do país, no início da década de 1980 houve um aumento contínuo no número de casos da doença no país com 169 mil casos no 1980 e 443 mil infectados em 1986 (96% e 99% provenientes da Amazônia, respectivamente) (Loiola et al., 2002; Brasil, 2015b). A Estratificação Epidemiológica, com início na década dos anos 80, foi uma tentativa de abordagem que levava em conta as características ambientais, epidemiológicas, sociais e econômicas da localidade. A abordagem se baseou no levantamento epidemiológico da doença com seleção das áreas de maior e menor transmissão nos municípios da região. Para efeito operacional foram estabelecidas áreas de prioridades para aplicação de recursos humanos, materiais e financeiros. A falta de sustentabilidade no apoio logístico de recursos foi a principal responsável pelo insucesso da estratégia. Já no ano de 1986, a Operação Impacto, foi planejada e executada (de forma tímida), na região amazônica do país. Com base na aplicação intradomiciliar do DDT e tratamento dos indivíduos infectado pelo plasmódio, esta operação utilizou o critério de zoneamento de áreas geográficas e populacionais prioritárias, afim de garantir de forma simultânea o combate vetorial e o tratamento humano em massa (justificado pela possibilidade de redução das altas incidências de malária nas localidades prioritárias). Vale salientar o início do uso da mefloquina (de maneira indiscriminada) no Brasil para o tratamento de *P. falciparum* quando estes se mostravam resistentes ao tratamento convencional utilizado na

³Pinotti M, Lôbo AGS, Damasceno G, Soares R. Experiências de campo com o sal cloroquinado. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 1955;7:5-23.

época. A principal crítica em relação a essa estratégia foi o gasto elevado de recursos humanos e financeiro dispendidos a tal mediada, pois de forma contrária ao esperado, ocorreu um aumento na transmissão da malária entre os anos de 1986 e 1988 (443.627 para 559.535 lâminas positivas, respectivamente), além do não aumento do número de diagnóstico realizado nos citados períodos (Deane, 1988; Tauil, 2011).

Diversas alterações ambientais e demográficas ocorreram como consequência do grande influxo de pessoas na região Norte do país (Singer, Castro, 2001). Diante do quadro da malária naquela região, por meio de um estudo realizado em um projeto de assentamento rural no estado de Rondônia, foi proposto um conceito conhecido como “malária de fronteira” para caracterizar a transmissão da doença na região (Castro et al., 2006). O conceito abrange fenômenos biológicos, ecológicos e sociodemográficos que atuam no decorrer do tempo em três níveis espaciais – individual (micro), comunidade e o estadual ou nacional. Temporalmente, três fases caracterizam a transmissão da malária nessas áreas agrícolas. Nos primeiros anos após a criação dos assentamentos, há uma fase epidêmica da doença, em decorrência de intensas alterações ambientais (como o desmatamento) promovendo o aumento de criadouros para o mosquito vetor, além de moradias precárias (casas de madeiras com frestas, por exemplo) facilitando a transmissão intradomiciliar pela picada da fêmea do vetor e a transmissão para outros indivíduos (Vittor et al., 2006). Essas localidades são áreas de alto risco para a infecção pelo plasmódio pelas condições já mencionadas além do estabelecimento na área de indivíduos sem imunidade à doença. Em uma fase posterior, fase de transição, ocorre um declínio gradual na transmissão da malária ao longo do tempo, consequência da diminuição das alterações ambientais, estabilização das comunidades, melhorias nas moradias e maior acesso aos serviços de saúde (Barbieri et al., 2005; Castro et al., 2006). A fase endêmica é estabelecida quando o nível de transmissão da malária é estável e com baixo número de casos e os fatores de risco à novos casos está diretamente relacionado a fatores comportamentais do homem. Em geral, nessas áreas há um predomínio de malária falciparum no momento inicial dos assentamentos, podendo ser gradualmente superado pelo *P. vivax* nos anos seguintes (Castro, Singer, 2011) devido principalmente as características biológicas do parasito (recaídas tardias da doença e a baixa parasitemia sanguíneas). Em adição as alterações ambientais na região, a descontinuidade dos programas de combate à doença foi outro fator agravante da situação da malária na Amazônia brasileira. Um agravamento da

situação economia do país entre as décadas de 1980 e 1990 culminou em uma deterioração dos serviços de saúde e dos indicadores sociais, refletindo no aumento de casos de malária na região amazônica (em 1985, os estados de Rondônia e Pará foram responsáveis por 73% do total de casos da doença no país) (Marques, 1987). Durante a década de 1990, a média anual de casos da doença superou 500 mil infectados, sendo registrado em 1999 623 mil casos de malária na região (Ferreira, Castro, 2016).

No Brasil, desde o ano 2000 as ações de vigilância, prevenção e controle da malária (e outras doenças transmissíveis), em âmbito nacional, são geridas pela Secretaria de Vigilância à Saúde (SVS) órgão subordinado ao Ministério da Saúde (MS). Além disso a SVS, realiza a investigação de surtos de doenças, coordena a rede nacional de laboratórios de saúde pública, promove a vigilância de fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, saúde ambiental e do trabalhador e também pela análise de situação de saúde da população brasileira (Ladislau et al., 2009; Brasil, 2015b). Dados oficiais evidenciam que cerca de 60% dos casos de malária confirmados laboratorialmente são tratados até 48 h posteriores ao surgimento de sintomas, prevenindo futuras complicações decorrentes da infecção (Brasil, 2015b). Entretanto, a vigente vigilância sindrômica vigente geralmente não identifica indivíduos assintomáticos portadores da infecção, que consequentemente não são diagnosticados e tratados pelo sistema local, podendo constituir potenciais reservatórios da infecção contribuindo para a manutenção da transmissão residual da doença (Alves et al., 2005; Abeyasinghe et al., 2012; Stresman et al., 2012; Sturrock et al., 2013a).

As funções da SVS incluem a coordenação de programas de prevenção e controle de doenças transmissíveis de relevância nacional, como aids, dengue, malária, hepatites virais, doenças imunopreveníveis, leishmaniose, hanseníase e tuberculose e do Programa Nacional de Imunizações (PNI); investigação de surtos de doenças; coordenação da rede nacional de laboratórios de saúde pública; gestão de sistemas de informação de mortalidade, agravos de notificação obrigatória e nascidos vivos, realização de inquéritos de fatores de risco, coordenação de doenças e agravos não-transmissíveis e análise de situação de saúde, incluindo investigações e inquéritos sobre fatores de risco de doenças não transmissíveis, entre outras ações. As atividades planejadas dentro da SVS são divulgadas na página eletrônica do órgão que levam em consideração o caráter estratégico da comunicação para a gestão da

saúde, nas ações de promoção, prevenção e controle de doenças. Especificamente, as ações de comunicação desenvolvidas e divulgadas pela SVS objetiva, principalmente, na elaboração de estratégias de trabalho desenvolvidas até mesmo por estados e municípios, a partir do suporte oferecido pela SVS/MS (Brasil, 2015b).

Figura 17 - Áreas infestadas pelo *Anopheles gambiae* (atualmente identificado como *An. arabiensis*) na região Nordeste do Brasil, 1960. Fonte: Serviço de Malária do Nordeste, Brasil (2015b)

Figura 18 - Regiões endêmicas de malária no Brasil, 1960 e 2014.
Adaptado de Ferreira e Castro (2016)

Atualmente no Brasil, o *P. vivax* é responsável por cerca de 85% do total de casos de malária no país, seguido pelo *P. falciparum* e, menos de 0,1% dos casos são atribuídos ao *P. malariae*. Este é um cenário diferente ao verificado na década de 1960 e início dos anos de 1970 e dos anos de 1980 quando a proporção de *P. vivax* e *P. falciparum* eram similares. Porém, no início dos anos a transmissão de malária vivax se manteve estável enquanto que casos de infecção por *P. falciparum* declinou, padrão ainda verificado nos dias atuais (**Figura 19**). Como consequência, houve uma diminuição no número de internações e mortes por malária no país (**Figura 20**), já que estes desfechos são em sua imensa maioria atribuídos à malária grave causada pelo *P. falciparum*. Fatores biológicos do *P. vivax* como as formas de hipnozoítos (Betuela et al., 2012; Shute, Marion, 1961; White, 2011; White, Imwong, 2012) que podem persistir por meses no hospedeiro, além da baixa parasitemia verificada nesse tipo de

infecção (Baum et al., 2016; Harris et al., 2010; Moreira et al., 2015), especialmente em áreas que se aproximam da eliminação da doença, dificultam o diagnóstico e o tratamento, sendo os principais contribuintes para o predomínio da malária vivax em relação às infecções por *P. falciparum* no Brasil. A droga antimalárica com atividade hipnozoitocida utilizada no Brasil (primaquina - PQ) requer um período relativamente longo de tratamento (7 ou 14 dias) aumento o risco de hemólise nos pacientes com dG6PD. Além disso, há poucos estudos explorando a eficácia do tratamento antimalárico, especialmente em relação a PQ nos diferentes esquemas terapêuticos adotados pelos países (Gonzalez-Ceron et al., 2015).

Dados atuais Ministério da Saúde revelam que três municípios no estado do Acre (Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Rodrigues Alves), um no Amazonas (Lábrea) e um no estado do Pará (Itaituba) são responsáveis por 52% dos casos de malária falciparum no país (**Figura 21**) (Brasil, 2015b). Em 2015, o Brasil lançou o plano estratégico para eliminação do *P. falciparum* no país projetando o cenário esperado para a doença em 2019 (**Figura 22**).

Figura 19 - Casos de malária reportados no Brasil entre os anos de 1959-2014.

Fonte: SISMAL, SIVEP-Malária e SINAN; Brasil (2015b)

* Recidivas foram excluídas).

Figura 20 - Tendência do número de internações e mortes causadas por malária no Brasil (2000-2014). Fonte: Brasil (2015b)

Figura 21 - Contribuição de municípios em relação à infecção por *Plasmodium falciparum* no Brasil, 2014. * Recidivas foram excluídas
Fonte: Brasil (2015b).

Figura 22 - Panorama atual da malária falciparum no Brasil (a) e, (b) cenário proposto para o ano de 2019. Fonte: Brasil (2015b)

2.2.2 Definições e estratégias na vigilância de malária

O maior desafio dos países que objetivam a eliminação da malária é de implementar estratégias efetivas, com um custo benefício viável, além da continuidade dos programas implementados (Newby et al., 2016; Sanders et al., 2012). Geralmente, o número de casos de malária e a disponibilidade de recursos financeiros determinam qual a estratégia mais viável de combate à doença em uma localidade. Os sistemas de vigilância locais planejam e, posteriormente executam suas atividades visando principalmente a redução da mortalidade e morbidade, em países em fase de controle da doença, além de medidas acerca da eliminação da infecção em locais com transmissão residual do parasito (WHO, 2015a). Em áreas de alta e moderada transmissão, rotineiramente o início dos programas de controle detalha mensalmente o número de casos de casos, de pacientes internados e de óbitos decorrentes de malária com o objetivo de identificar o comportamento dessas variáveis em relação ao tempo e em áreas geográficas específicas. Em algumas localidades, com a diminuição do número de casos o risco de surtos (epidemia) tende a aumentar, fazendo com que o sistema de vigilância atue na identificação de potenciais focos epidêmicos. Com a queda no número de casos graves e de mortes, o serviço de informação pode trabalhar com os casos de morte e malária severa de maneira individual por regiões geograficamente delimitadas afim de priorizar os esforços na redução desses casos nessas áreas (Cortter et al., 2013). Um sistema de vigilância efetivo em malária consiste em:

- a) identificar grupos populacionais ou áreas prioritárias no combate à doença;
- b) monitorar e identificar situações que requerem intervenção mais efetiva, como os casos de epidemias, por exemplo, além de;
- c) avaliar as medidas de controle adotadas.

O conjunto de procedimentos, ferramentas, estrutura organizacional, além do quadro de pessoas compõem o sistema de vigilância, que é utilizado para planejar, monitorar e avaliar os programas de controle de malária. Basicamente o desenho de um programa de vigilância depende de dois fatores. O primeiro consiste no nível de transmissão malária e, o segundo, os recursos (humano e financeiro) para se conduzir a vigilância. Em uma fase inicial, a de controle, onde muitas vezes há grandes números de casos, não é possível reagir a cada caso confirmado de maneira individual, ou seja, as análises realizadas se baseiam em números agregados e a

intervenção ocorre em nível populacional. Com a redução progressiva na incidência da doença, muitas vezes faz-se necessário trabalhar com casos individuais para identificar grupos ou áreas prioritárias para ações de controle (WHO, 2013, 2016a).

No Brasil, desde o ano 2003, o órgão responsável pelo controle de malária é a SVS, órgão subordinado ao Ministério da Saúde. Criado no mesmo ano, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) é o responsável pelo planejamento, execução e fiscalização dos projetos de combate à doença ao nível nacional. O PNCM é responsável pela implementação de estratégias de intervenção a serem implantadas ou fortalecidas de forma integrada, de acordo com as características da malária em cada área. As principais ações do programa estão fundamentadas no fortalecimento da vigilância da malária, com aumento no acesso e na qualidade do diagnóstico e tratamento, na capacitação de recursos humanos, controle seletivo de vetores, pesquisas básicas e aplicadas, supervisão do programa, além do apoio à estruturação dos serviços locais de saúde e na sustentabilidade política. Os dois últimos componentes se referem a importantes elementos para sustentação do controle da doença (Ladislau et al., 2009; Brasil, 2014). A vigilância epidemiológica acerca da malária no Brasil tem como objetivos principais, estimar a magnitude da morbidade e mortalidade da malária, identificar grupos, áreas e períodos de maior risco, detectar precocemente epidemias, avaliar se a transmissão local de casos em áreas onde há transmissão foi interrompida, recomendar medidas necessárias para prevenir ou reduzir a ocorrência de casos e, avaliar o impacto das medidas de controle aplicadas (Brasil, 2014). O Brasil adota como métodos laboratoriais de confirmação diagnóstica de casos de malária o teste de gota espessa ou o teste rápido, este último utilizado principalmente em comunidades de difícil acesso (como áreas indígenas e de garimpo) e na região extra-amazônica (**Figura 23**). Preconiza-se que o teste laboratorial seja feito o mais rapidamente possível, em menos de 24 h após a identificação de um caso febril suspeito. A investigação epidemiológica de um caso serve para nortear as atividades de prevenção e controle da malária, principalmente na identificação do local onde é mais provável que a doença ocorreu. A Figura 24 esquematiza a busca ativa de casos que é recomendada após a notificação de mais de um caso positivo de malária, indivíduos sintomáticos ou não, em um provável local onde se deu a infecção. A orientação atual do PNCM é de que seja realizada a busca de casos da doença preferencialmente em raio de 1 km do local provável da infecção e do local da residência do caso (Brasil, 2014).

Figura 23 - Medidas a serem adotadas após a suspeita de um caso. a) Diagnóstico de gota espessa ou esfregaço sanguíneo. b) Diagnóstico do teste rápido para malária. Adaptado de Brasil (2014a)

¹ **Área receptiva**: área onde existe a possibilidade de transmissão de malária pela presença do mosquito vetor

² **Detecção ativa**: busca dos possíveis casos de malária (sintomáticos ou não), em um raio de 1 km, podendo ser estendido de acordo com a capacidade operacional.

Figura 24 - Procedimentos adotados pelos órgãos locais de vigilância em endemias mediante a identificação de um caso positivo de malária.
Adaptado de Brasil (2014a)

2.2.3 Estágios no programa de combate à malária

Distribuída mundialmente de maneira não uniforme, países com casos de malária se encontram em diferentes fases em relação a situação da doença (**Figura 25**). Apesar das diferenças conceituais e operacionais acerca dos termos erradicação, controle e eliminação, a OMS classifica os países em quatro fases no programa de combate à malária, baseado na taxa de lâminas positivas (ou RDTs) e na taxa de incidência: controle, pré-eliminação, eliminação e prevenção do reestabelecimento da doença. A definição ampliada de controle da malária consiste na eficácia das intervenções adotadas para se reduzir a incidência de casos a níveis baixos não constituindo mais um problema de saúde pública local, mas com a possibilidade de ocorrência de transmissão mesmo com a ausência de casos importados (Cohen et al., 2010; WHO, 2007). A interrupção da transmissão da doença é meta final dos programas de controle da malária. A maioria dos países com histórico da doença

encontra-se atualmente nesta fase, alguns em estágio de pré-eliminação em diversas áreas dentro de seu território (WHO, 2015a). A eliminação da malária ocorre quando há interrupção local da transmissão da doença pelo mosquito vetor em uma área geográfica definida, embora casos importados possam ocorrer nessa área fazendo com que as medidas de intervenção aplicadas pela vigilância local seja contínua (WHO, 2008). Definições mais recentes sobre a eliminação da malária enfatizam a dificuldade de se manter a incidência local da doença a zero, ou seja, as intervenções empregadas surtiram efeito significativo provocando a interrupção da transmissão endêmica local e limitando a subsequente transmissão de infecções importadas abaixo de um limiar a partir do qual o risco de reestabelecimento da protozoose é minimizado (Cohen et al., 2010; WHO, 2016a). Operacionalmente, um país se encontra em fase de eliminação da doença quando a incidência de casos de malária por ano é menor que um para cada mil habitantes vivendo em área de risco para a doença (WHO, 2007). Ressalta-se a necessidade de iniciativas regionais e forte comprometimento político para se levar adiante o plano de eliminação da malária (WHO, 2015a). Uma área onde a cadeia epidemiológica de transmissão humana do plasmódio pelo mosquito do gênero *Anopheles* foi interrompida em todo o país por três anos consecutivos, recebe o certificado de área livre de malária pela Organização Mundial da Saúde. Atualmente a Europa é uma região livre de casos de malária humana (WHO, 2015a). O termo erradicação é designado pela permanente interrupção dos casos de uma determinada doença (redução a zero) em nível mundial como resultado dos esforços empregados, onde intervenções não são mais necessárias (WHO, 2016b). Algumas definições oriundas da OMS são utilizadas por diversos países para nortear o desenho de seus programas de vigilância na malária (**Tabela 2**) (WHO, 2016a), além de levar em consideração a possibilidade de execução total do plano, incluindo a situação entomológica, comprometimento político e de recursos e de potenciais ameaças de insucesso da estratégia, como a situação da malária nas áreas vizinhas.

Figura 25 - Classificação dos países em relação a malária. Adaptado de WHO (2012b)

Tabela 2 - Sistema de Vigilância em malária de acordo diferentes áreas de transmissão e fases de combate à malária
(continua)

<i>Transmissão</i>	Fase de controle		Fase de eliminação
	Alta e moderada	Baixa	Muito baixa
<i>Prevalência (período de 2 – 9 anos)</i>	$\geq 10\%$	$< 10\%$	
<i>Incidência</i>	Frequente casos e mortes relacionadas à doença em um período < 5 anos.	Casos e mortes são pouco comuns e estão distribuídos de acordo com a exposição ao mosquito vetor.	Casos esporádicos.
	Variação temporal limitada.	Há variação entre os anos e sazonalidade. Risco de epidemia.	Casos importados podem ter uma alta proporção em relação ao número total.
	Variação geográfica limitada.	Heterogeneidade geográfica; muitas vezes a doença está concentrada nas populações marginalizadas ou áreas remotas (comunidades indígenas, por exemplo).	Distribuição focal.
<i>Casos febris</i>	Alta proporção de casos febris decorrentes da malária.	Baixo número de casos febris relacionados à infecção por malária.	Proporção de casos febris decorrentes de um número muito baixo de infecção pelo plasmódio (podendo ser aumentado em focos da doença).

Tabela 2 - Sistema de Vigilância em malária de acordo diferentes áreas de transmissão e fases de controle (conclusão)

	Fase de controle		Fase de eliminação
<i>Transmissão</i>	Alta e moderada	Baixa	Muito baixa
<i>Atendimento no sistema de saúde</i>	Altos números devido à malária.	Baixa proporção decorrentes da infecção pelo plasmódio.	
<i>Vetor</i>	Eficiente	Controlado de maneira eficiente / ineficiente.	Controlado de maneira eficiente / ineficiente.
<i>Objetivos do programa</i>	Redução de casos e da mortalidade.	Redução de casos.	Eliminação da transmissão.
<i>Sistema de vigilância</i>			
<i>Recursos</i>	Baixo investimento <i>per capita</i> ; baixa qualidade na prestação e na acessibilidade aos serviços.	Ampla disponibilidade ao diagnóstico e ao tratamento.	Condições necessárias para se investigar cada caso.
<i>Dados utilizados</i>	Números agregados (nível populacional).	Números agregados. Listagem de todos os casos, incluindo pacientes internados e mortes.	Detalhes do caso.
<i>Investigação</i>	Casos de internação	Todos os casos, incluindo casos de internação.	Casos individuais.

Fonte: (WHO, 2012)

Países que se encontram na fase de controle da malária possuem áreas de alta ou moderada transmissão da doença, além de localidades de baixa incidência da doença. Locais com elevado número de casos de malária são geralmente caracterizados pela alta incidência da doença em crianças menores de cinco anos de idade e gestantes, alta proporção de infecção por *P. falciparum*, alta proporção de casos febris relacionados às infecções pelo plasmódio, alta frequência de mortes decorrentes da doença, além de uma alta eficiência e densidade de mosquitos vetores (WHO, 2012b). Geralmente estas áreas de intensa e moderada transmissão são regiões de baixa condição econômica, onde vivem grupos populacionais marginalizados e com escasso acesso aos serviços básicos de saúde. Primariamente os programas de combate à malária nessas localidades priorizam a redução da mortalidade e, posteriormente a redução no número de casos de maneira rápida e economicamente possível; ambas as medidas são ferramentas utilizadas para se medir o impacto do programa acerca da doença. Áreas de baixa transmissão geralmente possuem baixa incidência da doença e a distribuição dos casos se distribuída de forma mais uniforme em todos os grupos etários ou populacionais dessas regiões. Há uma taxa de mortalidade reduzida e existe, em muitas localidades uma sazonalidade na transmissão da doença, havendo alto risco para epidemias. Casos importados podem contribuir com altos números em relação ao total de casos. A espécie *P. vivax* é mais prevalente nessas regiões em comparação ao *P. falciparum*, especialmente em regiões de clima subtropical e tropical fora do continente africano. A principal estratégia contra a malária se baseia no diagnóstico precoce e o tratamento imediato contra o plasmódio além do controle vetorial. Áreas candidatas a eliminação da malária são caracterizadas pela transmissão focal (ou de casos esporádicos). O sistema de vigilância prioriza a detecção de casos individuais e novos casos de infecção o qual permite, por meio de investigação epidemiológica e ferramentas de biologia molecular, classificar os casos como adquirido localmente (autóctones, introduzidos ou recaídas) e também os casos importados; estes por sua vez podem contribuir com uma proporção significativa em relação ao número total, além de aumentar o risco para a reintrodução da doença em áreas consideradas livres da malária; o combate ao mosquito vetor é outra abordagem usual nessas localidades (WHO, 2015b).

Em face as diferenças regionais dentro de um território (ou de um país) aliadas aos diferentes níveis de transmissão da malária e a capacidade de implementar e gerenciar seus programas de controle da doença, não existem critérios fixos para se nortear o desenho do sistema de vigilância. Muitos países em fase de controle com áreas geográficas caracterizadas pela baixa transmissão podem adotar em algumas localidades medidas usadas por áreas que se encontram em fase de eliminação. Diferentes abordagens podem ser adotadas em diferentes localidades dentro de um mesmo país, especialmente onde a intensidade de transmissão possui uma ampla variação geográfica (Chiyaka et al., 2013; Ferreira, Castro, 2016; WHO, 2015a).

Em geral, a dimensão do sucesso dos programas de combate à malária depende do modelo de sistema de saúde adotado (principalmente o acesso ao diagnóstico precoce e o tratamento rápido da infecção), condições socioambientais, demográfica, política e econômica atual, determinantes biológicos acerca do parasito, dos indivíduos e do mosquito anofelino, além do grau de investimento em programas direcionados ao combate ao paludismo. Geralmente os programas de eliminação da malária nos países são geridos por ministérios da saúde. Muitas estratégias de controle são baseadas de acordo com a situação epidemiológica em relação à malária atual do país (APMEN, 2011; Cohen et al., 2010; WHO, 2012b).

Na atualidade, 110 países possuem o certificado de áreas livres de malária (onde, pelo menos no período de três anos, não ocorre notificação de casos autóctones), 67 estão na fase de controle da doença e, 33 encontram-se na fase de eliminação da doença. No ano de 2016, o Sri Lanka foi declarado como área livre da doença (WHO, 2016a). O Brasil é um país classificado na fase de controle da malária (WHO, 2016a). Entretanto, dados da SVS/MS classificam os cenários de eliminação da transmissão de *P. vivax* (**Figura 26**) e *P. falciparum* no país (**Figura 27**). Dos 5.565 municípios brasileiros, em relação à transmissão de *P. vivax*, foram classificados 156 municípios em fase de controle, 38 em pré-eliminação, 447 em fase de eliminação e 4924 em fase de prevenção da reintrodução da malária vivax (**Figura 28**). Em relação à malária falciparum, 22 municípios estão em fase de controle, 53 em pré-eliminação, 219 em eliminação e, assim como Acrelândia, 5276 municípios em fase de prevenção da reintrodução (**Figura 29**). Baseado nos dados do ano de 2015, o Município de Acrelândia configura-se como uma área em fase de prevenção da reintrodução do *P. falciparum* (1 caso importado) e, em fase de pré-eliminação do *P. vivax* (53 casos) (Brasil, 2016). Recentemente, foi criado o projeto de equipe de apoiadores municipais

para trabalhar com os municípios prioritários na gestão local do controle da malária. Trata-se de uma equipe formada por profissionais da área da saúde distribuídos por municípios da região amazônica, nos estados do Amazonas, Acre, Amapá, Pará e Roraima, além das cidades de Brasília e Rio de Janeiro. Estes apoiadores foram capacitados para analisar dados epidemiológicos e orientar intervenções de controle da malária, de acordo com os protocolos de trabalho do PNCM. É um trabalho conjunto com os órgãos de vigilância locais afim de repassar para os serviços de saúde uma metodologia de trabalho que possa ser assumida pelas estruturas de vigilância e controle da malária no estado e município, após a vigência do projeto, perpetuando assim práticas viáveis no controle de malária (Brasil, 2016).

Figura 26 - Mapa epidemiológico da malária vivax no Brasil. Adaptado de Brasil (2014)

Figura 27 - Mapa do cenário de eliminação do *P. falciparum* no Brasil.
Adaptado de Brasil (2014)

Figura 28. Fase dos municípios em relação ao *Plasmodium vivax*, Brasil.
Fonte: Brasil (2015b)

Figura 29 - Plano estratégico de eliminação do *Plasmodium falciparum* no Brasil (2014-2019). Fonte: Brasil (2015b)

2.2.4 Malária vivax: do controle à eliminação

Plasmodium vivax é dentre as cinco espécies causadoras da malária humana a mais dispersa geograficamente no mundo, sendo responsável, por cerca de 15,8 milhões de casos sintomáticos no mundo em 2013. Apesar de representar globalmente cerca de 8% dos casos de malária, o *P. vivax* é a causador de 47% dos casos da doença fora da África sub-Saariana (WHO, 2015b). A espécie foi colocada como um dos grandes desafios do *Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030*, cujo objetivo é a eliminação da malária em 35 países e a redução das taxas de incidência e mortalidade em 2013. Apesar da malária causada pelo *P. falciparum* ser responsável pela maioria dos casos, da gravidade clínica e de mortes causadas pela doença, há uma notória preocupação mundial em relação aos casos, a gravidade da doença e à incidência de *P. vivax*. Recentes relatos, na Índia (Kochar et al, 2009), Papua Nova Guiné (Genton et al., 2008) contradizem a ideia benigna da infecção por *P. vivax*, demonstrando que cada vez mais a infecção por essa espécie está associada aos casos graves de malária. Manifestações clínicas anteriormente atribuídos somente à infecção por *P. falciparum*, como complicações cerebrais, dificuldades respiratórias, complicações hepáticas e renais, além de relatos de morte fazem atualmente parte da epidemiologia da malária vivax (Mendonça et al., 2015; Saravu et al., 2014; Val et al., 2014). A malária vivax, em 2013, foi responsável por cerca de 16 milhões de casos, sendo que deste número, 1 milhão de casos ocorreram na Índia, Etiópia, Indonésia e Paquistão. Apesar dos altos índices, houve uma redução de 35% no número de casos de malária vivax desde o ano de 2000. Mundialmente, a incidência regional de *P. vivax* tem aumentado consideravelmente enquanto a um decréscimo no número de casos de *P. falciparum* (Ferreira et al., 2007; Ferreira, Castro, 2016; WHO, 2015b). Estima-se que um terço da população mundial, principalmente América Latina e Ásia, estão sob risco de infecção por *Plasmodium vivax*. O Brasil persiste como o país que mais contribui com o número de casos de malária vivax nas Américas (PAHO, 2016a; WHO, 2015b).

No ano de 2015, em uma assembleia da OMS enfatizou as metas e estratégias contra a malária vivax, principalmente em reduzir em 90% a incidência e as taxas de mortalidade em nível global, além da eliminação da espécie em 35 países. O *P. vivax* é geograficamente mais diversificado do que o *P. falciparum*, onde cerca de 2,85 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para esta espécie, principalmente na

região Central e Sudeste da Ásia e na América Latina (**Figura 30**) (WHO, 2015b). Na América Latina e no Caribe muitos países são endêmicos para a malária; pequenos países do Caribe além de Jamaica, Bahamas, Cuba, Chile e Uruguai são recentemente consideradas áreas livre de malária. Em fase de eliminação da doença estão países como o México, Haiti, Costa Rica, El Salvador, Panamá, Argentina e Paraguai (PAHO, 2014; WHO, 2015b).

Figura 30 - Número estimado de infecções por *Plasmodium vivax* em diferentes países, 2013. Adaptado de WHO (2015a).

Países, principalmente da Ásia, América Central e América Latina, estão obtendo resultados positivos em seus programas de controle da malária com significativa redução na incidência de malária falciparum. Entretanto, o número de casos de infecções por *P. vivax* nesses países tendem a se estabilizar ou até aumentar em algumas localidades, evidenciando a maior dificuldade de se controlar e eliminar a malária transmitida por *P. vivax* (**Figura 31**). Esta espécie predomina em países onde o programa de malária se encontra em fase de pré-eliminação e eliminação (**Figura 32**) (WHO, 2015b).

Figura 31 - Tendência de casos de *Plasmodium vivax* entre o período de 2000 – 2013. Adaptado de WHO (2015b).

Figura 32 - Porcentagem de casos de infecção por *Plasmodium vivax* e os respectivos estágios dos programas de países em regiões fora da África sub-Saariana, 2013. Adaptado de WHO (2015b).

Diversas variáveis podem ser apontadas como potenciais obstáculos em relação a eliminação de *P. vivax*. Fatores biológicos do parasito e o comportamento do vetor implicado na dispersão da espécie implicam nos maiores desafios para programas de controle da infecção por *P. vivax* quando comparado ao *P. falciparum* (Alves et al., 2002; Meshnick, 2015; Moreira et al., 2015; Mueller et al., 2009).

Basicamente os programas de controle e eliminação de malária concentra-se em duas formas: 1) diagnóstico rápido e tratamento precoce dos indivíduos infectados e, 2) controle vetorial, ambas medidas visam interromper a cadeia de transmissão entre seres humanos e para o mosquito vetor. A eficácia das abordagens adotadas depende das características biológicas, socioambientais, culturais e políticas que diferem entre regiões endêmicas (Ferreira, Castro, 2016; Silveira, Rezende, 2001; Suarez-Mutis et al., 2007; Vitor-Silva et al., 2016). Em diversas áreas da região amazônica brasileira, inclusive áreas de baixa transmissão da malária vivax, as maiores dificuldades para o controle e eliminação dessa espécie se encontra nos fluxos migratórios de pessoas de regiões não endêmicas e endêmicas, características dos assentamento agrícolas nessas localidades, já que na maioria das vezes as ocupações acontecem de forma desordenada sem um levantamento prévio da malária na área de assentamento, sistema de trabalho que privilegia o extrativismo, fazendo

com que o homem adentre a floresta para extrair madeira, castanha-do-Norte, realizar atividades de caça e ou pesca, além de construir suas moradias próximas aos criadouros dos mosquitos, a resistência do plasmódio aos antimaláricos de uso frequente nessas regiões e, por fim mudança de hábitos dos anofelinos, vetores da malária, além do pouco efeito dos inseticidas de ação residual (Alves et al., 2002; Barbosa et al., 2015; Barreto et al., 2011; da Silva-Nunes et al., 2010).

2.2.4.1 *Biologia do Plasmodium vivax*

Particularidades na biologia do *P. vivax* atuam diretamente como obstáculos para o seu controle e eliminação (Bousema et al., 2014; Ferreira, Castro, 2016; Shute, Maryon, 1961; Van den Eede, 2010a; White, 2013; WHO et al., 2015b).

A duração do período pré-eritrocítico do *P. vivax* (período de incubação) geralmente costuma ser curto, em média de 6 a 8 dias. Entretanto, o período de incubação prolongado dessa espécie pode variar de semanas a meses. Este fenômeno foi descrito pela primeira vez no início do século XX por Korteweg na Holanda e pode estar relacionado ao pequeno número de esporozoítos inoculados ou a um polimorfismo dos esporozoítos, com a inoculação de formas conhecidas como bradiesporozoítos ou hipnozoítos. Outras formas de inoculação são os taquizoítos que produzem um período de inoculação muito curto (em média 7 dias). A possibilidade de tempo de incubação prolongado pode ser devido a diferentes fenótipos, outra possibilidade é a mudança o ciclo biológico de genótipos preexistentes, considerando-se que um período de incubação prolongado pode conferir vantagens a sobrevivência do parasito. Característica que parece estar também associada com os longos períodos de incubação principalmente em região de clima temperado e frio e o curto período das recaídas em áreas tropicais e endêmicas, favorecendo a transmissão do plasmódio e um aumento da sua morbidade (White, Inwong, 2012). A presença de formas dormentes intra-hepáticas e as persistentes infecções assintomáticas parecem ser o maior desafio para a eliminação da malária vivax (Harris et al., 2010; Lindblade et al., 2013; Mueller et al., 2009; Okell et al., 2012; Simões et al., 2014; White, 2011; White et al., 2012; White, Inwong, 2012). Há evidências de uma dependência direta entre o número de recaídas com a quantidade de hipnozoítos em hepatócitos; esta quantidade por sua vez aparenta ser proporcional ao número de total picadas recebida pelo indivíduo durante o repasto sanguíneo pela fêmea do mosquito infectado

(Shanks, White, 2013). As recaídas poderiam estar relacionadas com a velocidade na aquisição da resposta imunológica, mesmo com as baixas cargas parasitárias características de infecções por malária vivax (Arnott et al., 2012; Betuela et al., 2012; Chen et al., 2016). Em decorrência da aquisição de imunidade, as taxas e o número de recaídas promovendo sintomas clínicos diminuiria no decorrer dos anos (White, 2011). Os mecanismos desencadeadores das recaídas em malária vivax ainda continuam desconhecidos. Algumas hipóteses surgem em relação a ativação de formas dormentes intra-hepáticas no indivíduo infectado. Como um provável desencadeador está o processo febril, podendo ser em consequência um outro episódio de malária, como uma infecção mista de *P. vivax* e *P. falciparum*, ou relacionado a uma coinfeção com um patógeno diferente (por exemplo, pela subespécie de bactéria *Salmonella enterica typhi*, agente da febre tifoide). Nesta revisão histórica sobre o tema por observação de relatos científicos decorrentes da II Guerra Mundial, os autores inferem, apesar das grandes limitações em relações aos dados, que componentes específicos que atuam na resposta inflamatória aguda do paciente (e não somente os envolvidos no processo febril), aparentam contribuir de maneira expressiva na ativação nas formas hipnozoíticas de *P. vivax* no indivíduo infectado (Shanks, White, 2013; White, 2011). Estas formas dormentes intra-hepáticas não detectadas pelos métodos de rotina aplicados no diagnóstico da malária, tornando estes portadores invisíveis ao sistema de saúde, além de focos de manutenção da doença. Os estágios latentes do *P. vivax* (hipnozoítos) ainda são responsáveis pela manutenção e ocorrência de novos episódios febris em indivíduos infectados, mesmo na ausência da transmissão vetorial, reduzindo drasticamente a eficácia dos programas de controle vetorial nessas áreas, além de aumentarem o risco potencial da transmissão (Bousema et al., 2012; Robinson et al., 2015). A presença de hipnozoítos dificulta a identificação e medidas de pontos favoráveis em testes terapêuticos e ensaios clínicos, já que não se consegue, rotineiramente, diferenciar, pelos métodos de diagnósticos empregados, casos de nova infecção, recaídas ou recrudescência, além da possibilidade de se introduzir um viés no momento de se medir e avaliar a eficácia dos programas de controle vetorial em relação a incidência de casos. (WHO, 2015b). Outro fator agravante é o tratamento dos hipnozoítos; o medicamento hipnozoitocida amplamente utilizado contra as formas latentes de *P. vivax* é a PQ. Existem dois esquemas terapêuticos recomendados; o primeiro, em um tratamento de 14 dias e, um segundo, chamado de esquema curto de uso da droga,

fazendo uso em 7 dias. Em relação ao esquema longo (14 dias) muitos pacientes abandonam o tratamento antes de completar o uso da medicação, favorecendo a sobrevivência das formas latentes hepáticas no indivíduo. Essa falta de adesão se dá principalmente a ideia equivocada de cura da doença já nos primeiros dias, por haver interrupção dos sintomas clínicos principais (como febre e cefaleia) decorrente da administração do esquizonticida sanguíneo (CQ); tal conduta favorece a sobrevivência das formas hepáticas latentes aumentando a probabilidade de recaídas da doença. Em relação ao esquema curto de tratamento com PQ, terapêutica adotada pelo Brasil, há poucos estudos comparando os diferentes esquemas (Gonzalez-Ceron et al., 2015), mas infere-se que a aderência a esse esquema abreviado seja melhor aumentando a eficácia do tratamento. O maior problema em relação a PQ é a sua contraindicação a alguns grupos de indivíduos. Gestantes não podem utilizar o medicamento durante a gravidez devido ao risco de hemólise do feto por deficiência da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (dG6PD), sendo contra indicada em menores de seis meses de idade e indivíduos com dG6PD pelo mesmo motivo. Há uma grande preocupação pois a deficiência hereditária de G6PD atinge cerca de 400 milhões de pessoas em áreas endêmicas para malária no mundo, ocorrendo mais de 10 milhões de casos de malária vivax por ano decorrente de formas dormentes do *P. vivax* no fígado do hospedeiro (Baird, 2015; Domingo et al., 2013; Monteiro et al., 2014). Em uma recente revisão da literatura, Monteiro e colaboradores verificaram a baixa prevalência da dG6PD relatada em alguns países da América Latina como na Argentina, Bolívia, México, Peru e Uruguai, mas em países como o Brasil, Equador, Jamaica, Colômbia, Cuba, Suriname e Trinidad, estudos geralmente de amostras de conveniência tem verificado uma prevalência de > 10% na dG6PD. Segundo os autores, nas Américas há um predomínio da mutação G6PD A-^{202A} variante Africana Selvagem (identificada em 81,1% dos indivíduos portadores da deficiência analisados em diferentes estudos (Monteiro et al., 2014). Esta variante também foi predominantemente na Venezuela, em um estudo transversal entre indivíduos residentes em áreas endêmicas para malária, reforçando a hipótese que tal variante foi introduzida, no período colonial, nas Américas por imigrantes africanos (especialmente escravos) e ou portugueses e espanhóis (Vizzi et al., 2016). Quando identificados, esses grupos recebem um tratamento alternativo contra hipnozoítos, geralmente doses semanais de esquizonticida (como a CQ). Acredita-se que, mesmo com o uso da terapia alternativa, há um aumento na morbidade e no número de

reservatórios da malária vivax aumentando assim o risco de transmissão, prolongando o processo de eliminação da doença, além da possibilidade de (re)introdução da espécie em áreas receptivas para a malária. Em um estudo longitudinal randomizado (duração de 40 semanas) envolvendo um total de 433 indivíduos na faixa etária de 1 a 5 anos de idade em Papua Nova Guiné, área com alta endemicidade para malária adicionada a coexistência entre as quatro espécies causadoras da malária humana, observou-se que a frequência de recaídas foi curta (em um mês), além de ser responsável por aproximadamente metade das formas parasitárias sanguíneas presentes na infecção e responsável por 60% dos sintomas clínicos em até três meses após o uso de artesunato e PQ, comparado com os indivíduos não tratados (controles). Os autores creditam as altas taxas de recaídas umas das principais causas da grande prevalência de *P. vivax* na faixa etária estudada em Papua Nova Guiné (Betuela et al., 2012).

Os estágios assexuados de *P. vivax* infectam preferencialmente reticulócitos (hemácias jovens, compreende menos de 2% do total das células vermelhas do sangue), enquanto que *P. falciparum* invade hemácias de qualquer idade, ainda que tendo uma preferência por células sanguíneas jovens. Esta característica de *P. vivax* é uma importante barreira para o cultivo dessa espécie de plasmódio, principalmente pela dificuldade de se manter *in vitro* eritrócitos jovens alvos das formas sanguíneas assexuadas do parasito (Thonsom-Luque, Scopel, 2016). Uma alternativa seria a identificação, pelo uso de marcadores moleculares, de possíveis populações de *P. vivax* que infectam hemácias com maior tempo de vida; assim, ao caracterizá-las, este genótipo poderia ser utilizado em culturas por um período maior de tempo, em um modelo de certa forma minimalista, de ocorrência incomum de infecções humanas por *P. vivax*, porém de grande valia para diversas linhas de estudo do parasito e sua interação com o hospedeiro invertebrado (Shaw-Saliba et al., 2016). As repetidas infecções e destruição das células sanguíneas podem ainda causar anemia grave nos pacientes infectados (Galatas et al., 2016; Genton et al., 2008; Karunajeera, Mueller, 2016). Frequentemente, as infecções por *P. vivax* possuem baixa carga parasitária no sangue periférico no paciente (20 a 50 mil parasitos por mm^3 de sangue) quando comparada a infecção por *P. falciparum* (em média >100 mil parasitos por mm^3 de sangue). As consequências associadas a não detecção, tanto pelo diagnóstico de gota espessa como pelos RDTs disponíveis no mercado, além do não tratamento desses casos, subestima a real prevalência da malária vivax, principalmente em áreas

de baixa transmissão que se aproximam da eliminação da doença (Ferreira, Castro, 2016; Harris et al., 2010).

Em relação as formas sexuadas do parasito, diferentes características biológicas em relação as espécies de plasmódio possuem implicações diretas nas estratégias de combate à malária. As formas sexuadas de *P. falciparum* passam por cinco estágios de desenvolvimento (I a V) e necessitam, em média, de 10-12 dias para atingirem o estágio maduro (V) (Bousema et al., 2014). Sete dias após o início dos sintomas clínicos somente o estágio gametocítico maduro pode ser encontrado na circulação sanguínea periférica do paciente e esses gametócitos podem persistirem por semanas na circulação sanguínea. Estágios V são sensíveis para doses de PQ abaixo de 0.25 mg/kg (WHO, 2012a). Ao contrário, gametócitos de *P. vivax* estão presentes desde o início da infecção, porém sobrevivem por poucos dias no sangue (3 a 4 dias) do paciente (Bousema et al., 2014). Devido a essas particularidades, a última espécie parece ser mais provável manter a transmissão para o vetor antes do diagnóstico e tratamento (Bousema et al., 2014; Lima et al., 2012; Val et al., 2014; WHO, 2015b).

Diferentemente do *P. falciparum*, o *P. vivax* pode se desenvolver e disseminar-se em regiões de climas temperado aumentando assim sua área geográfica de incidência. Fato esse que poderia estar diretamente relacionado ao fato de viajantes de áreas não-endêmicas para regiões onde a malária vivax está presente podem, ao retornar ao local de origem, introduzir o *P. vivax* em localidades de clima frio ou temperado, receptivas mediante a presença de um vetor potencial para a transmissão. Outro fator contribuinte para sua ampla distribuição geográfica do *P. vivax* adicionado a um aumento no período de sua transmissibilidade, reside no fato que, no interior do mosquito vetor, seu desenvolvimento (ciclo esporogônico) ocorre mais rápido (em média de 10 dias a 25 °C) quando comparado ao *P. falciparum* que necessita de aproximadamente 12 dias a uma faixa de temperatura maior. Este fator tem implicações negativas em programas de controle que utilizam-se de ferramentas para se diminuir a longevidade do mosquito transmissor (Beavogui et al., 2010; WHO, 2015b).

Classicamente, a infecção por *P. vivax* ocorre somente em hemácias que expressam o grupo sanguíneo Duffy (em inglês *Duffy antigen receptor for chemokines* – DARC), consequentemente, indivíduos geneticamente deficientes para esse grupo sanguíneo (*Duffy* negativo) seriam refratários por completo à infecção por *P. vivax*.

Esta é uma provável explicação para a ausência (ou raridade) de malária vivax na África Ocidental, região onde a população é predominantemente *Duffy* negativa. Entretanto, estudos relataram que este fator de proteção contra infecções por *P. vivax* não é absoluta. Existem relatos na literatura que esta espécie de plasmódio, na ausência do DARC utiliza-se de receptores alternativos para invadir hemácias (Ménard et al., 2010), no Brasil (Cavasini et al., 2007) e em países da África sub-Saariana (Mendes et al., 2011; Ryan et al., 2006). De forma contrária, o *P. falciparum* utiliza diversos receptores de eritrócitos para invadi-los o que aumenta a eficiência de infecção nas células sanguíneas (Ferreira, 2012).

2.2.4.2 Da infecção assintomática ao quadro de malária grave

Classicamente conhecida por seu curso benigno, a malária vivax tem como característica possuir a grande maioria dos indivíduos infectados que não apresentam sintomas (ou sintomatologia bem escassa) (Baum et al., 2016). Entretanto, diferentes estudos desafiam a ausência de morbidade decorrente da infecção por *P. vivax* (De Mast et al., 2015; Genton et al., 2008; Jakobsen et al., 1994; Laishram et al., 2012; Martins et al., 2014; Medina-Morales et al., 2016; Nankabirwa et al., 2013). O grande desafio para dimensionar fatores preditores e causais na doença associada pela infecção por *P. vivax*, consiste basicamente em decorrência de sua baixa densidade parasitária no sangue do paciente, inviabilizando muitas vezes a detecção de formas parasitárias por métodos convencionais de diagnóstico (Abeyasinghe et al., 2012; Cortter et al., 2013; Ferreira e Castro, 2016; Van den Eede et al., 2010; Wammes et al., 2013). Em indivíduos de áreas não endêmicas, a infecção por *P. vivax* geralmente possui paroxismo febril em até 48 h (*febre terça*), com febre, cefaleia e calafrios como sintomas mais vigentes que poderiam ser acompanhados por dores nas articulações e na região abdominal (Ferreira, 2012; Rey, 2008). Embora raros, casos graves causados por infecção de *P. vivax* são, geralmente, caracterizados pela baixa parasitemia no indivíduo infectado, fato semelhante ao que ocorre em *P. falciparum* (Melo et al., 2014; Mendonça et al., 2015). Acredita-se na ocorrência de uma subestimação da real biomassa parasitária que o indivíduo alberga e sua contribuição para o aparecimento (ou não) de sintomas clínicos. Há uma probabilidade (apesar de nunca visualizada) que tal cenário possa se instalar devido ao sequestro de parasitos do sistema vascular, por exemplo para o baço, o que estaria mascarado pela

visualização da baixa parasitemia sanguínea (De Mast et al., 2015; Genton et al., 2008; Jakobsen et al., 1994). Em casos de infecção por *P. vivax* tem se relatado semelhante mecanismo patogênico decorrente de uma maior resposta inflamatória e a produção de citocinas, provocando alterações como trombocitose, exacerbada ativação de plaquetas, lesão de célula endotelial e deficiência de respostas vasomotoras (Jakobsen et al., 1994). As manifestações clínicas e a patogenia da malária severa por *P. vivax* é similar ao que ocorre na malária falciparum como anemia severa (< 5 mg hemoglobina/dL), trombocitopenia, edema pulmonar agudo, complicações renais e, mais raramente, malária cerebral (Mendonça et al., 2015; Nurleila et al., 2012). Particularmente relatado em crianças, a malária vivax é responsável pela anemia severa nesse grupo de indivíduos (Genton et al., 2008; Medina-Morales et al., 2016), quadro que pode se agravar com múltiplas recaídas, além de estar relacionada diretamente a desnutrição, aborto espontâneo e retardo do crescimento do feto em gestantes. Apesar de ainda escassos, alguns estudos evidenciaram casos graves e mortes causadas por *P. vivax*, especialmente em crianças, em diversas regiões endêmicas. Diferentes estudos publicados no mesmo ano, por Mittal et al. (2014) e Saravu et al. (2014), relataram a gravidade dos sintomas e mortes por malária vivax em hospitais da Índia. Os primeiros autores, em um estudo transversal, observaram que cerca de 50% dos pacientes com malária vivax apresentaram uma ou mais complicações decorrentes da doença como anemia severa (26,0%) e malária cerebral (12,5%); seis mortes foram atribuídas aos casos de malária vivax (Mittal et al., 2014). Já o segundo grupo de pesquisa relatou que em pacientes com mais de 7 dias de hospitalização a chance (*odds*) de mortalidade foi estatisticamente significante aumentada para malária cerebral, edema pulmonar síndrome respiratória aguda anemia severa e outras complicações da infecção pelo plasmódio (Saravu et al., 2014). Em um estudo observacional em um hospital na região oriental do Sudão, apesar de não evidenciarem diferença estatisticamente significante entre as manifestações clínicas graves causadas por malária vivax e por *P. falciparum*, observou-se uma média parasitária alta em pacientes com malária severa por *P. vivax* quando comparados com malária falciparum grave (5.934,2 versus 13.906,6 parasitemia de estágios assexuados/ μ L, $P = 0.013$) (Abdallah et al., 2013). Diferentemente, pacientes analisados em um hospital da Indonésia apresentaram uma probabilidade três vezes aumentada de apresentarem complicações clínicas em malária falciparum quando comparados à infectados por *P. vivax* (Nurleila et al., 2012).

Em um estudo transversal em uma área endêmica da Colômbia (Medina-Morales et al., 2016), com crianças menores de 14 anos de idade, foi constatado que 8,1% dos casos positivos para *P. vivax* apresentaram um ou mais critérios atribuídos à malária severa como anemia grave, disfunção renal e síndromes respiratória. No Brasil, existem poucos dados sobre a malária grave por *P. vivax*. Porém existem relatos da ocorrência da complicação da doença principalmente na região da Amazônia brasileira (Lacerda et al., 2012; Martins et al., 2014; Melo et al., 2014; Mendonça et al., 2015).

2.2.5 Pilares da Estratégia no combate à malária

O sucesso dos esforços para redução da incidência e a eliminação de do *P. vivax* em diferentes localidades requer ações integradas em diversas frentes, como a ampliação e fortalecimento dos programas de malária, desenvolvimento de novas ferramentas, especialmente de diagnóstico e tratamento, aliadas a um programa permanente e contínuo de política e financiamento (Cortter et al., 2013; Newby et al., 2016; WHO, 2016a). As intervenções na malária requerem um alto investimento econômico e promovem consideráveis retornos nos investimentos em saúde pública (Cortter et al., 2013; El-Moamly, 2013; Tusting et al., 2015). Há uma meta internacional da OMS de eliminar a malária em 35 países até 2030, posteriormente novas definições e estratégias deverão ser elaboradas e discutidas afim de planejamento para a eventual erradicação desta doença (Newby et al., 2016). Em relação ao fortalecimento dos programas de controle da malária vivax, muitas estratégias são utilizadas em comum contra *P. falciparum*, como, por exemplo, o combate ao mosquito vetor (redução da transmissão humano para o mosquito e da transmissão vetor para o humano) e o diagnóstico precoce e o tratamento imediato de indivíduos infectados (Kunene et al., 2011; Meshnick, 2015; WHO, 2016a).

2.2.5.1 Técnicas de diagnósticos e tratamento

Inovações nas técnicas de diagnósticos para a detecção de casos de malária fazem necessárias como uma ferramenta fundamental para a eliminação da malária, além de garantia da aplicação universal dos testes de diagnósticos aos indivíduos suspeitos de malária (Bousema, Drakeley, 2011; WHO, 2011). A expansão dos

exames de microscopia e ou teste rápido fornecerá dados que servirão de subsídios para o planejamento de estratégias pelo sistema de vigilância local, como por exemplo monitorar os casos confirmados da doença afim de determinar áreas prioritárias (ou suspeitas) de combate à doença (WHO, 2012b). A precisão do método de diagnóstico para se identificar e, posteriormente tratar com antimalárico, as infecções pelo plasmódio é fundamental para se planejar estratégias de combate a doença visando principalmente a redução da transmissão local. Dentre os maiores desafios para as técnicas de detecção da malária reside em se identificar os portadores assintomáticos da infecção (geralmente relacionado à baixa carga parasitária), além de técnicas moleculares mais sensíveis e específicas que auxiliem na detecção de infecções ocasionadas por diferentes espécies ou por mais de um clone da mesma espécie (Batista et al., 2014; Bousema, Drakeley, 2011; Chen et al., 2016; Koepfli et al., 2015; Moreira et al. 2014), além de casos importados da doença (El-Moamly, 2013).

2.2.5.1.1 Métodos convencionais

O encontro de formas intraeritrocíticas do plasmódio em amostras de sangue periférico é o principal alvo do diagnóstico laboratorial da malária humana. Os esfregaços sanguíneos são a melhor forma de distinção das espécies de plasmódios infectando o homem. A técnica mais utilizada para o diagnóstico da malária é a técnica da gota espessa, que por envolver um volume relativamente grande de sangue periférico do paciente examinado em cada campo microscópico, possui uma sensibilidade relativamente alta, além do baixo custo e sua fácil aplicação (Ferreira, 2012; Mbakilwa et al., 2012). Um parâmetro essencial para o prognóstico clínico é a quantificação de parasitos que o exame de gota espessa fornece com a amostra de sangue do paciente. No Brasil, usualmente se utiliza do método de gota espessa para se quantificar a parasitemia estimada, sendo este classificado em categorias previamente definidas. Com base no número de parasitos por campo microscópico, a amostra é classificada em:

- a) Menos de 40 parasitos no exame de 100 campos, registra-se o número de parasitos encontrados;
- b) Meia cruz (+/2), quando em 100 campos forem observados, em média, de 40 a 60 parasitos; c) duas cruzes (++), encontro de 2 a 20 parasitos por campo; d)

três cruzeiros (+++), para 21 a 200 parasitos por campo; e) quatro cruzeiros (++++), para mais de 200 parasitos por campo (Brasil, 2013).

Entretanto, quando comparado ao *P. falciparum*, o número de parasitos circulantes na infecção por *P. vivax* é mais baixa, dificultando a visualização de formas sanguíneas desta espécie pelas técnicas convencionais (resultados falsos positivos). Relatos na literatura apontam que em áreas de baixa transmissão da doença, a sensibilidade do método de gota espessa pode ser até duas vezes menos eficaz na detecção do parasito quando comparados a métodos moleculares de diagnóstico (Alves et al., 2005; Barbosa et al., 2015; Moreira et al., 2015). Pacientes com ausência de sintomas ou indivíduos oligoassintomáticos geralmente possuem baixa carga parasitária, sendo duplamente invisíveis para o sistema de vigilância que rotineiramente aplicam o método de gota espessa, primeiro porque não são alvos da estratégia de busca dos casos e, segundo por não se conseguir visualizar as formas parasitárias presentes no sangue desses indivíduos devido à baixa carga parasitária circulante; em países de baixa endemicidade de malária esses indivíduos são os maiores responsáveis para a manutenção da transmissão local (Abeyasinghe et al., 2012; Alves et al., 2002; Bousema, Drakeley, 2011; Waltmann et al., 2015). Outra dificuldade para o diagnóstico são as formas parasitárias latentes de *P. vivax* que podem permanecer em indivíduos infectados por anos (White, 2011). Consequentemente, esses grupos de indivíduos quando não diagnosticados de forma correta e, consequentemente não tratados, fazem o papel de reservatórios da malária, contribuindo de forma significativa para a manutenção da infecção (Arnott et al., 2012; Ferreira, Castro, 2016; White et al., 2012). Desenvolvido no início dos anos de 1990 como um método alternativo ao diagnóstico de gota espessa, os testes de diagnóstico rápido (TDRs) se baseiam na detecção de três diferentes tipos de antígenos do *Plasmodium* (Murray et al., 2008); uma proteína rica em histidina do *Plasmodium* 2 (da língua inglesa, *histidine rich protein 2* – HRP2) que pode ser específica tanto para *P. vivax* como para *P. falciparum*. Uma desidrogenase láctica do parasito (da língua inglesa, *lactate dehydrogenase* – LDH) específica para *P. vivax* ou *P. falciparum*, além de uma variante e uma aldolase que pode ser comum a todas as espécies do protozoário. Pela combinação da detecção desses três antígenos associada a um teste imunocromatográfico, os TDRs foram desenvolvidos para serem espécie-específico (*P. falciparum* ou *P. vivax*) ou útil na detecção de infecções por ambas espécies (Murray et al., 2008). Em contrapartida ao exame de gota espessa, a grande

vantagem dos TDRs reside em sua simplicidade, exigindo pouco treinamento e sem a necessidade de equipamentos complexos, possibilitando que agentes de saúde possam realizar os exames imunocromatográficos em campo (WHO, 2011). Os TDRs possuem alta acurácia na detecção da malária (El-Moamly, 2013), entretanto, assim como o diagnóstico de gota espessa possui sérias limitações em infecções com baixa parasitemia (Ndao et al., 2004), além de seu custo elevado. Outras limitações do teste consiste na não identificação – por nenhum dos três antígenos utilizados – para *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*, pacientes com altas cargas parasitárias de *P. falciparum* podem apresentar resultado falso positivo com teste de LDH utilizado para detectar *P. vivax*, ao contrário da microscopia os TDRs não são utilizados para quantificar as parasitemias além disso, devido ao fato de HRP-2 não ser eliminado do sangue por até 30 dias após o tratamento, os TDRs para este antígeno não devem ser utilizado para monitorizar a resposta à terapia antimalárica (Chandramohan et al., 2002). Embora LDH e a aldolase serem rapidamente eliminadas do sangue após o tratamento, gametócitos podem permanecer no sangue do indivíduo após o tratamento antimalárico padrão e assim, continuar a produzir todos os três antígenos (Murray et al., 2008; WHO, 2011).

2.2.5.1.2 Técnicas alternativas de diagnóstico

Apesar do resultado positivo para o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) ser alvo de discussão, principalmente ao limite da carga parasitária para o tratamento do indivíduo infectado (Bousema, Drakeley, 2011), atualmente o PNCM considera que pacientes com PCR positivo para malária, mesmo assintomáticos, podem infectar mosquitos e ou se tornarem sintomáticos, sendo assim estes devem ser tratados quando o diagnóstico for realizado unicamente por essa técnica molecular, seguindo os critérios de preenchimento da notificação pelo SIVEP-malária (Brasil, 2014). O uso da técnica de PCR no diagnóstico da malária iniciou-se nos anos 80 e, atualmente as técnicas mais utilizadas no diagnóstico do parasito são o *Nested* PCR, PCR convencional e o PCR em tempo real (qPCR). Estudos tem demonstrado que técnicas de PCR são mais sensíveis e específicas quando comparadas às técnicas convencionais e ao teste imunocromatográfico (Moreira et al., 2015), portanto com capacidade de detecção do parasito em pacientes com baixa parasitemia, mas a interpretação dos resultados positivos ainda é discutida (Baum et al., 2016;

Congpuong et al., 2012; Cook et al., 2015; Harris et al., 2010). Além do alto custo, a necessidade de infraestrutura e mão de obra especializada torna o uso do método ainda limitado à pesquisa científica. Todavia, sua utilização em ambientes de pesquisa possibilita uma reanálise da prevalência global e epidemiologia da infecção intra e entre populações (Bousema et al., 2014). Atualmente, uma técnica derivada do PCR, chamado de LAMP (do inglês, *loop mediated isothermal amplification*) surge como uma técnica mais simples que a PCR. O LAMP se baseia na amplificação de ácidos nucléicos em uma faixa estável de temperatura (60 a 65 °C), usando uma enzima com propriedades de deslocamento e iniciadores específicos para alvos distintos na sequência de interesse (Notomi et al., 2015). É considerada uma técnica eficiente de amplificação de DNA partindo-se de um pequeno número de cópias. Estudos realizados em diferentes localidades relatam sensibilidade e especificidade da técnica variável dependendo do local de estudo (Oriero et al., 2014; Pöschl et al., 2010). A facilidade de aplicação em trabalhos de campo é uma das vantagens do método, já que se apresenta mais rápido que técnicas de PCR, é realizado em termo blocos e os resultados podem ser analisados pela incidência de luz ultravioleta (UV), (Cook et al., 2015), visto que, em campo, condições para realização de técnicas moleculares para diagnóstico são atualmente pouco viáveis (Oriero et al., 2014). No ano de 2010 foi realizado um estudo com amostras de sangue de 105 pacientes na Tailândia, onde os pesquisadores compararam a sensibilidade e especificidade de três métodos de diagnóstico gênero-específico e espécie-específico: microscopia, PCR e LAMP. Quanto à espécie, LAMP e PCR apresentaram especificidade e sensibilidade de 100%, para infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* (exceto em dois casos em que, no teste de PCR, a especificidade de infecções por *P. falciparum* foi de 91%, e quando testadas novamente, apresentaram 100%, sugerindo contaminação, e em infecções por *P. vivax*, em que o teste por PCR apresentou especificidade de 99%), enquanto que a microscopia apresentou sensibilidade de 92% e especificidade de 93% para *P. falciparum*, e sensibilidade de 68% e especificidade de 98% para *P. vivax*. Em relação ao gênero, os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (Pöschl et al., 2010). Em uma recente revisão sistemática sobre a detecção de infecções subpatentes de *P. vivax*, verificou-se que a prevalência média das infecções detectadas por microscopia foi cerca de 67% menor quando comparada com a prevalência por PCR (Moreira et al., 2015). As técnicas sorológicas de detecção de anticorpos geralmente são aplicadas em triagem de bancos de doadores de sangue e

em estudos epidemiológicos, entretanto ainda não são viáveis no diagnóstico individual por não distinguirem infecções atuais de pregressas (Rosas-Aguirre et al., 2015). Em um estudo na Somália, em uma região de baixa transmissão de malária, os autores verificaram que o diagnóstico sorológico pode ser uma ferramenta útil no monitoramento da variação espacial da malária e na avaliação dos esforços empregados no combate à doença (Bousema et al., 2010).

Faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas de diagnósticos que possam detectar de maneira mais rápida as baixas parasitemias, em indivíduos assintomáticos, que possam auxiliar no monitoramento de potenciais focos da doença (Cook et al., 2015; Mueller et al., 2009; WHO, 2015a), além de testes rápidos no auxílio ao exame de G6PD, principalmente no caso de tratamento de formas latentes de *P. vivax* (Domingo et al., 2013; Frank et al., 2005; Ley et al., 2015; WHO, 2015b).

2.2.5.1.3 Diversidade genética

Um emergente consenso sugere que o estudo da diversidade genética de plasmódios pode ser uma ferramenta importante para programas de eliminação da malária em diferentes regiões (Escalante et al., 2015; Imwong et al., 2006; Koepfli et al., 2011; Pearson et al., 2016). Com o objetivo global de eliminação da malária vivax em 35 países até 2030, mapeamento global e local da estrutura populacional de *P. vivax* é essencial para se alcanças os objetivos para as estratégias de eliminação dessa espécie (Arnott et al., 2012). Os estudos da população genética de *P. vivax* são necessários para se conhecer a diversidade de sua distribuição e sua dinâmica populacional, como as diferentes populações do parasito se distribuem entre as diferentes localidades, principalmente em relação a sua prevalência, espécies de vetores, possíveis hospedeiros genéticos e as diversidades das influencias ambientais (Reid et al., 2010). Entretanto tal pensamento esbarra nos modelos de estudos empregados para esse objetivo; além disso, principalmente para a área de saúde pública, não se conhece a contribuição relativa de mecanismos dependentes de seleção natural e de processos evolutivamente neutros (por exemplo, deriva gênica ou a migração), tanto para a dispersão espacial quanto para a dinâmica temporal de polimorfismos (Baniecki et al., 2015; Batista et al., 2015; Feng et al., 2003; Gunawardena et al., 2014).

A diversidade na cadeia epidemiológica da malária vivax evidencia que em áreas endêmicas diferentes clones de *P. vivax* podem infectar o mesmo indivíduo ou estar presentes em diferentes hospedeiros. O conhecimento da estrutura populacional local do parasito além da sua diversidade genética contribui não só para estudos da epidemiologia molecular, identificando e monitorando os diferentes tipos de infecções para auxiliar no planejamento e execução dos programas de combate à doença (Imwong et al., 2015; Koepfli et al., 2015), além dos níveis elevados de infecções por múltiplos clones de *P. vivax* aumentar a virulência do parasito, além de clones dos parasitos competir para os recursos disponíveis dentro do hospedeiro infectado e influenciar em sua sobrevivência contra intervenções com os antimaláricos (Havryliuk, Ferreira, 2009; Orjuela-Sánchez, 2010). Ainda como um fator limitante está a comparação entre estudos de diferentes localidades. A diversidade genética de *P. vivax* pode variar grandemente dependendo da região do estudo. Isolados obtidos de populações distintas podem ser diferentes geneticamente, assim as infecções múltiplas são facilmente determinadas usando um único marcador molécula, ou eles ou podem ter muito baixos níveis de diversidade clonal ou mesmo ser no caso de muito baixa transmissão ou epidemias, que faz com que seja mais difícil distinguir verdadeiras infecções policlonais das causadas por um único clone (Van den Eede et al., 2010). Genotipagem para determinar infecções múltiplas podem ser feitas utilizando um ou dois marcadores que são altamente polimórficos ou um grande número de marcadores globais com baixo polimorfismo (Batista et al., 2015; Koepfli et al., 2009; Orjuela-Sánchez, 2010).

Apesar de significativos avanços em estudos envolvendo a estrutura populacional e diversidade genética de plasmódios nessa última década, ainda existem poucas contribuições para o entendimento sobre a contribuição de mecanismos dependentes de seleção natural e de processos evolutivamente neutros, como a deriva gênica ou a migração, tanto para a dinâmica temporal quanto para a dispersão espacial de polimorfismos com relevância clínica ou para a saúde pública, principalmente em áreas que se aproximam da eliminação da malária. Outra limitação em relação à infecção por *P. vivax* diz respeito a não detecção de formas dormentes do parasito que constituem reservatórios responsáveis pela diversidade genética dos parasitos na infecção humana (Imwong et al., 2007, 2012; White, Imwong, 2012). Apesar dos avanços em relação a técnica de genotipagem, ainda não é possível distinguir com precisão se a infecção sanguínea vigente é originária de uma nova

inoculação de esporozoítos pelo mosquito vetor ou de uma recaída ocasionada por hipnozoítos (Barry et al., 2015).

O plasmódio causador da malária contém três genomas: o nuclear com 14 cromossomos haploides com aproximadamente 23 megabases (Mb) e duas moléculas de DNA extra cromossômico; o DNA circular de 35 Kilobases (Kb) ou genoma do plastídeo, e o genoma mitocondrial de 6 Kb (Feagin et al., 1997). O genoma de *P. vivax* é aproximadamente três Mb maior do que o genoma de *P. falciparum*, sendo que, esta diferença está principalmente representada por regiões não codificantes. O número de genes entre as duas espécies é muito similar (5433 para *P. vivax* e, 5403 em *P. falciparum*), sendo eu daqueles genes com função conhecida (1817) em *P. falciparum*, cerca de 80% estão presentes em *P. vivax*, e o restante são únicos para cada espécie (Orjuela-Sánchez, 2008). Sendo assim, existem marcadores moleculares específicos de acordo com o tipo de genoma-alvo do estudo. O genoma mitocondrial é amplamente utilizado como marcador molecular para estudos filogenéticos e populacionais de parasitos da malária. Além de estar presente em um grande número de cópias (20 a 150 por célula), evolui de modo direto de transmissão genética, sem recombinação ou outros rearranjos genéticos, cerca de 5 a 10 vezes mais rapidamente que o genoma nuclear (Cornejo, Escalante, 2006). O genoma de *P. falciparum* é altamente polimórfico, abundante em microssatélites (MSTs) e menos variável em polimorfismos de base única (SNPs) em relação ao *P. vivax*; entretanto, o genoma de *P. vivax* apresenta um número relativamente baixo de MSTs. Até recentemente, o principal obstáculo para o estudo da diversidade genética de *P. vivax* residia na escassez de marcadores genéticos adequados para seu uso em larga escala. Grande parte dos estudos de polimorfismos em *P. vivax* utilizam-se de marcadores codificantes de antígenos, como em genes que codificam proteínas de superfície de merozoítos 1 e 3 α (*PvMSP1* e *PvMSP3 α*), além dos marcadores codificantes de genes associados com resistência a drogas, como os genes que codificam para a *pvdhfr* (*dihidrofolato redutase*), associada com resistência a pirimetamina, *pvm-dr1* (*Plasmodium vivax Multidrug-Resistance Gene 1*) e *pvcrt-o* (*Plasmodium vivax Chloroquine Resistance Trasnporter-Ortholog*), genes estes ortólogos ao *pfmdr1* e *pfcr-t* associados a resistência à CQ em *P. falciparum*. Tais marcadores moleculares podem ser informativos sobre o grau de variação intraespecífica, porém, por estarem sob pressão seletiva, pode ser que o padrão de diversificação nesses genes não reflita de maneira significativa o que ocorre no

genoma do parasito como um todo (Orjuela-Sánchez, 2010). Os MSTs são amplamente utilizados em estudos de genética de populações de plasmódio devido à sua suposta neutralidade em termos evolutivo, seu alto grau de polimorfismo (Carlton et al., 2008) e sua onipresença em todos os genomas do gênero. Trata-se de regiões de DNA que contêm repetições em series de motivos (conservados ou degenerados) de um a seis nucleotídeos. Eles representam regiões instáveis do genoma, ou seja, regiões com frequência de mutação e recombinação muito maior que as observadas nas sequências de cópia única, além de uma elevada taxa de mutação (da ordem de 10^{-2} eventos por replicação). Esta instabilidade dos MSTs resulta em marcadores altamente polimórficos. Os alelos diferem principalmente no número de repetições em série, devido ao *crossing over* desigual, durante a meiose, ou ao deslizamento da DNA polimerase, durante a replicação do DNA (Ellegren, 2004). Estudos evidenciam que a estrutura genética do *P. falciparum* está associada com a intensidade da transmissão, consequentemente estrutura e a diversidade populacional variam amplamente de acordo com a localização geográfica pelo menos em uma escala mundial. Populações de *P. falciparum* em regiões de alta transmissão caracterizam-se pela alta proporção de infecções múltiplas e baixos níveis de desequilíbrio de ligação (DL) sugerindo significantes *outcrossing* e frequente recombinação (Mu et al., 2005). Em uma área rural de baixa transmissão de malária na Amazônia Ocidental Brasileira observou-se, em estudo da diversidade genética entre populações simpátricas de *P. falciparum* e *P. vivax*, uma alta diversidade genética e uma grande frequência de infecções múltiplas por *P. vivax* quando comparadas com *P. falciparum*. Também foi observada a substituição frequente de haplótipos predominantes microssatélites ao longo do tempo entre a população de *P. vivax* (Ferreira et al., 2007). Com o objetivo de investigar a dinâmica do polimorfismo de *P. vivax*, 85 amostras coletadas durante os três primeiros anos de um estudo de coorte em uma área de assentamento agrícola, no município de Lábrea, Estado do Amazonas, Amazônia Ocidental Brasileira, verificou-se uma diversidade genética de moderada a alta, com 78% de infecções por múltiplos clones (IMC) e com um forte desequilíbrio de ligação (DL). Os autores relatam uma pequena influência temporal na diversidade genética dos haplótipos do parasita e a ausência de um padrão de distribuição espacial dos mesmos (Batista et al., 2014).

Principalmente em áreas de baixa transmissão, um paradoxo em relação as infecções múltiplas nessas localidades ainda produz questionamentos sobre as

causas desse fenômeno. Alguns estudos relatam que as formas latentes (hipnozoítos) dessa espécie aparentam ser a principal responsável por um paradoxo das infecções por mais de um clone nessas áreas (Batista et al., 2015; Gunawardena et al., 2014; Van den Eede et al., 2010). Os hipnozoítos poderiam contribuir de forma significativa com o aumento de superinfecção por um segundo (ou mais) clones, potencialmente resultando na reativação de hipnozoítos heterólogos e um aumento na probabilidade da ocorrência de recombinação meiótica, consequentemente aumentando a diversidade genética dentro das populações (Ferreira et al., 2007, Gunawardena et al., 2014; Van den Eede et al., 2010). Uma singularidade na biologia do *P. vivax* pode ser o principal responsável por este aparente paradoxo das infecções múltiplas em áreas de baixa transmissão. Os estágios latentes (hipnozoítos) do parasito aumentam a probabilidade de superinfecção com um segundo clone, potencialmente resultando na reativação de hipnozoítos heterólogos e um aumento na probabilidade de ocorrer recombinação meiótica, por fim aumentando a diversidade genética dentro das populações (Ferreira et al., 2007, Gunawardena et al., 2014; Van den Eede et al., 2010; White et al., 2011). Apesar dos recentes avanços nessa área de estudo, ainda há uma série de desafios e limitações para o desenvolvimento de uma tal abordagem, dentre estas a seleção da quantidade no número e tamanho dos microssatélites adequado para ser usado para determinação do genótipo é crucial para se obter resultados precisos (Brito, Ferreira, 2011). Aumento no número de marcadores investigados aumenta a probabilidade para se detectar infecções policlonais (Havryliuk, Ferreira, 2009). Em adição, sabe-se que o comprimento de repetição pode influenciar a diversidade associada a um microssatélite, com grandes conjuntos de di, tri ou tetranucleotídeos repetidos mais diversas do que as sequências mais curtas (Ferreira et al., 2007; Imwong et al., 2006; Rezende et al., 2010). Com base no conjunto de dados genômicos e, principalmente trabalhos de tipagem molecular realizados por nosso grupo de trabalho (Batista et al., 2015; Ferreira et al., 2007; Orjuela-Sánchez, 2010) e outros grupos de estudo (Koepfli et al., 2009; Van den Eede, 2010) contribuíram para a escolha dos marcadores genéticos utilizados nesse trabalho, sendo dois MSTs (*MS16* e o *Pv3.27*), além de um marcador de genes que codificam proteínas de superfície de merozoítos (*msp1F3*), com o objetivo de analisar as possíveis conexões epidemiológicas entre os indivíduos infectados. Os polimorfismos de base única (SNPs do inglês s*ingle-n*u*cleotide* p*olymorphisms*) consistem em pequenas variações de nucleotídeos (inserções ou deleções) nas sequências de

bases nitrogenadas na molécula de DNA. São marcadores geralmente bi-alélicos, ou seja, são encontradas duas bases nitrogenadas ao longo do alinhamento das sequências, sendo considerado o marcador genético mais estável, com taxa de mutação da ordem de 10^{-9} eventos/replicação e de tipagem mais reproduzível. A abundância de SNPs encontrada em *P. vivax* (Feng et al., 2003) torna possível a confecção de mapas gênicos de alta resolução dessa espécie, facilitando os estudos de associação, ao nível genômico, entre mutações e genótipos de interesse em populações de parasitos (Orjuela-Sánchez et al., 2010). A técnica de dissociação em alta resolução (do inglês: “high resolution melting” – HRM) consiste em um método de baixo custo, homogêneo, rápido e simples de análise pós-PCR para se genotipar os SNPs de *P. falciparum* que atualmente foi padronizado para se investigar a diversidade genética de *P. vivax* (Baniecki et al., 2015), sendo portanto uma ferramenta útil para monitorar a transmissão da malária vivax, avaliar as intervenções e assim, auxiliar na no desenho de programas de eliminação da doença. Trata-se de um método suficientemente sensível para se detectar a mudança de apenas uma base entre as sequências de nucleotídeos (Grundy et al., 2003) sendo atualmente uma ferramenta útil na identificação de *P. vivax*. Um *barcode* de SNPs para *P. vivax* contém uma combinação desses marcadores que em conjunto expressam um padrão singular de variação para a sequência do parasito (Baniecki et al., 2015).

A utilização de diferentes marcadores (e técnicas) moleculares que envolvam baixo custo, alta sensibilidade e simplicidade técnica tem sido o grande desafio da utilização da ferramenta de genotipagem na saúde pública. Embora amplamente utilizados com eficazes marcadores para se detectar a diversidade genética de *P. vivax* e as infecções multiclonais, os MSTs possuem a limitação da dificuldade de comparação de amostras entre diferentes laboratórios (devido principalmente a padronização do método) e evidencia-se um menor poder discriminatório dos MSTs em relação aos SNPs (Ball et al., 2010).

2.2.5.1.4 Tratamento antimalárico

Administrar o medicamento a todos os casos confirmados de malária é crucial para se interromper a cadeia de transmissão da malária (Ferreira, Castro, 2016; WHO, 2009). Com o objetivo principal da melhora na adesão ao tratamento de infecções por *P. vivax*, o Brasil utiliza como padrão o esquema terapêutico de 7 dias (esquema curto)

contra as formas latentes do parasito, onde em adultos, são administrados ao longo de três dias 25 mg de CQ por quilograma de peso, associada a 0,5 mg de PQ por quilograma de peso, diariamente por 7 dias. Todavia, não há estudos que avaliem a eficácia terapêutica da PQ administrada em 7 dias (30 mg/dia) contra os hipnozoítos em relação ao regime anteriormente empregado no país (15 mg/dia durante 14 dias). Um esquema terapêutico alternativo é aplicado para gestantes, lactentes e crianças menores de 1 ano de idade, já que não devem fazer uso da PQ devido ao alto risco de hemólise. Recomenda-se doses semanais de CQ (5 mg/kg) durante três meses para tentar suprimir as recaídas. Relatos recentes evidenciam a proporção de pessoas residentes em áreas endêmicas de malária vivax com deficiência da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (dG6PD) (Monteiro et al., 2014). Tais indivíduos, no tratamento da malária vivax, devem receber uma dose menor (0,75 mg/kg) do que a usual de PQ, afim de reduzir o risco de hemólise, como esquema alternativo de tratamento contra formas hipnozoíticas e gametocíticas do parasito (Brasil, 2010). Os testes para deficiência de G6PD ainda não fazem parte da rotina em áreas endêmicas, principalmente devido a sua complexidade e alto custo (Val et al., 2014; WHO, 2015). A tafenoquina é um medicamento hipnozoitocida que surge como alternativa à PQ. O curso de tratamento mais curto é uma importante vantagem prática em pessoas que não têm dG6PD entretanto, a meia-vida mais longa do medicamento pode ter consequências mais acentuadas se administrada indevidamente a pessoas com dG6PD (Rajapakse et al., 2015). A emergência e a disseminação de genótipos de *P. vivax* resistentes às drogas usualmente empregadas no tratamento são relatados em diversas localidades. Mais recentemente foram relatados casos de resistência do *P. vivax* a CQ na região amazônica brasileira (Aguilar et al., 2014; Alecrim et al., 1999, Santana Filho et al., 2007) e boliviana (Añes et al., 2015). Assim faz-se necessário pesquisas de novas drogas anti-gametócitos de *P. vivax* como alternativa para propostas de eliminação da malária vivax (Val et al., 2014), bem como melhorar o sistema de farmacovigilância e o monitoramento dos casos de resistência às drogas de uso frequente em áreas malarígenas (WHO, 2009, 2015a). Com apoio da Organização Pan-americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), no ano de 2001, uma importante iniciativa foi firmada entre países das Américas do Sul e Central com a formação da Rede Amazônica de Vigilância da Resistência aos Antimaláricos (RAVREDA), que contam com financiamento de recursos dos próprios países participantes e de fundos externos. Inicialmente a

RAVREDA foi formada com o objetivo principal de monitorar a resistência dos plasmódios aos antimaláricos e promover a mudança de políticas de medicamentos quando necessário. Hoje, a iniciativa inclui diversas linhas de trabalhos como a melhoria do acesso ao diagnóstico e tratamento, atua na prevenção da emergência de resistência às drogas antimaláricas, na melhoria da vigilância epidemiológica e entomológica em áreas afetadas pela malária, além do controle de qualidade dos medicamentos e outros produtos para prevenção e controle de malária (Brasil, 2014a).

2.2.5.2 Controle vetorial

O controle vetorial é um ponto crucial para o sucesso nos programas de controle e eliminação da malária. Fatores ambientais influenciam diretamente na capacidade dos mosquitos anofelinos em transmitir os parasitos e sua tolerância frente as medidas de controle empregadas. As medidas de combate ao mosquito vetor devem levar em consideração a transmissão silvestre (quando o indivíduo adentra a mata para atividades de trabalho, por exemplo), além da transmissão peridomiciliar e domiciliar do plasmódio pelo mosquito vetor (WHO, 2013).

Duas principais estratégias no combate ao vetor podem ser utilizadas de acordo com as características socioambientais da região (Brady et al., 2016). A primeira refere-se a aplicação de mosquiteiros impregnados com piretróides de ação residual, a medida mais utilizada no combate ao vetor no Brasil e a segunda, a pulverização residual interna dos domicílios. Entretanto, o principal gênero de vetores da malária no Brasil, gênero *Anopheles*, especialmente pela espécie *An. darlingi* (Moutinho et al., 2011), possui a característica de realizar o repasto sanguíneo principalmente ao anoitecer (após às 18 horas) em indivíduos dentro e fora de suas residências. Assim, a medida mais utilizada atualmente no combate ao mosquito vetor – uso de mosquiteiros impregnados com piretróides – é pouco eficaz para sua finalidade e contribui pouco para a redução na malária vivax. Uma limitação técnica da utilização da borrifação domiciliar residual na região Amazônica, principalmente em áreas rurais, se dá pela forma como é feita as residências nessa localidade, onde a maioria das casas possuem parede feitas de madeira (ou taipa) onde há frestas o que permite a fácil circulação do mosquito entre o meio externo e o interno, além da pouca fixação do inseticida limitando sua ação. Este quadro foi um dos grandes obstáculos enfrentados pela FUNASA em relação ao controle vetorial, pela aplicação do inseticida

residual DDT, na região Amazônica no início dos anos de 1980, no auge da migração humana para aquela região (Ferreira, Castro, 2016; Tauil et al., 2011). Em muitas regiões métodos complementares, como os larvicidas, poderão ser aplicados no combate aos criadouros dos vetores (WHO, 2012c). Em um estudo para se avaliar a intervenção com larvicida em Dar es Salaam, importante cidade da República Unida da Tanzânia, os pesquisadores concluíram que seu uso em larga escala contribuiu de forma significativa na redução da prevalência da malária na área urbana da cidade (Maheu-Giroux, Castro, 2013). De acordo com a OMS, a vigilância entomológica deve permitir uma resposta eficaz no controle de vetores, por meio de dados epidemiológicos e entomológicos locais, informações sobre resistência aos inseticidas, dados sobre a paisagem local principalmente sobre as intervenções que poderiam estar influenciando na densidade e no comportamento vetorial (WHO, 2015a). O monitoramento dos parâmetros epidemiológicos gera informações complementares aos dados epidemiológicos, ambientais e socioeconômicos úteis para o planejamento das intervenções e na avaliação da dinâmica da transmissão e do impacto das medidas adotadas. No Brasil, as atividades de vigilância entomológica são registradas nas fichas dos Sistemas de Informações Vetores-Malária, assim, auxiliam não somente no controle vetorial, mas também quanto à seleção de produtos químicos para controle dos mosquitos e nas alterações nas políticas de manejo de inseticidas (Brasil, 2014a). Em áreas endêmicas, como a Região Amazônica, a vigilância entomológica prioriza áreas com maior número de casos autóctones e, também locais de uso intensivo de inseticidas. Uma diversidade de ferramentas são utilizadas pelo Ministério da Saúde para o controle vetorial de uma determinada área ou região dependendo das características ambientais (clima e período dos ciclos das águas) além da capacidade operacional do sistema de vigilância em malária de cada localidade. O manejo integrado de vetores visa a otimização dos recursos para o controle vetorial por meio da tomada de decisão racional, o qual deve ser custo-efetivo e com o emprego de ações sustentáveis compatíveis com o sistema de saúde local. A medida de controle químico de vetores adultos, atualmente é baseada na:

a) borrifação residual intradomiciliar por pulverização de inseticida nas paredes internas dos domicílios. Um fator importante para que uma ação de borrifação intradomiciliar seja efetiva, é necessário que, na localidade onde ela vai ocorrer, a cobertura mínima de residências atendidas seja de no mínimo 80%;

b) nebulização espacial, são ações que não devem ser utilizadas na rotina de controle vetorial, pois, devido à efemeridade da ação e à enorme quantidade de variáveis ambientais e entomológicas envolvidas, a ação é, normalmente, muito pouco efetiva. Recomenda-se que esse tipo de intervenção deva ser utilizada somente em situações de surtos e epidemias com o objetivo de diminuir a população de mosquitos potencialmente infectados, não devendo ser utilizada em áreas esparsas;

c) uso de mosquiteiros impregnados com inseticida de longa duração que objetiva a redução na quantidade de mosquitos picando no interior das residências (diminuição da transmissão intradomiciliar). Vale ressaltar que para garantir a cobertura ótima é preciso que a distribuição seja de forma gratuita e que sejam instalados diretamente pelos agentes de saúde informando a população quanto à importância do uso diário, à limitação no número de lavagens e ao uso adequado dos mosquiteiros.

Uma outra ferramenta recomendada no combate ao vetor concentra-se na intervenção sobre as formas imaturas do mosquito. O controle larvário de *Anopheles* deve-se priorizar o manejo ambiental por meio de medidas definitivas como por drenagem, aterro e modificação do fluxo da água, pois normalmente possuem maior impacto na transmissão de malária. Métodos alternativos como tratar criadouros artificiais e de pequeno porte por meio de biolarvicidas, fazendo, concomitantemente, controle da vegetação (macrófitas) aquática e limpeza das margens destas coleções de água podem somar para o sucesso das medidas. Na região amazônica, na maioria das situações, é muito difícil atingir os níveis de cobertura necessários para impactar a transmissão de malária com medidas de controle a base de biolarvicidas. Assim, deve-se salientar que o controle dos insetos adultos tem maior impacto sobre a capacidade vetorial do que as atividades de controle larvário, pois, para terem efeito na transmissão, as medidas de controle larvário devem impactar de forma importante a densidade de formas imaturas (Brasil, 2014a).

2.2.5.3 Ação multisetorial

De fundamental importância no combate à malária é o apoio de setores externos à saúde. Estratégias de desenvolvimento regional devem englobar setores como da educação e do ambiente, voltados especialmente para a educação ambiental, afim de se ter uma política sólida e continua de uso sustentável do meio ambiente, além de setores de infraestrutura e emprego para que se possa reduzir não

só a incidência da doença, mas também reduzir a pobreza e a desigualdades sociais dessas localidades (Tusting et al., 2015; WHO, 2016a). No Brasil, existe um trabalho entre diversos setores com o objetivo de se fortalecer o programa de combate à doença no país. Desde o ano de 2014, os projetos de assentamento de reforma agrária e outros empreendimentos sujeitos ao licenciamento ambiental em áreas de risco ou endêmica para malária necessitam da obtenção do Laudo de Avaliação do Potencial Malarígeno (LAPM) e obter, quando solicitado no LAPM, a aprovação do Plano de Ação para o Controle de Malária (PACM) para posterior emissão do Atestado de Condição Sanitária (ATCS). Esse processo deverá ser realizado pelo empreendedor e orientada pelo órgão de saúde competente no processo de licenciamento ambiental. No documento devem constar informações sobre identificação das características da atividade ou do empreendimento que podem potencializar a transmissão de malária. Somente após a aprovação do PACM é que órgão de saúde competente emite o ATCS, documento condicionante da Licença de Instalação (Brasil, 2014c). No Brasil há uma evidente preocupação com o crescimento de casos de malária nos últimos anos em comunidades mais vulneráveis, como os povos indígenas e localidades rurais de difícil acesso como áreas de disputas de terras e garimpos clandestinos. Em relação à saúde indígena, há um esforço entre órgãos como a Secretaria Especial de Saúde Indígena (SESAI), estados e municípios para que seja desenvolvido e implementado programas de vigilância em saúde afim de atender integralmente à saúde indígena, considerando que esse grupo populacional apresenta uma continua migração e relação com diferentes áreas receptivas para malária em diferentes áreas (Brasil, 2014a).

Visando atender as políticas e programas do Sistema Único de Saúde (SUS), a Vigilância em Saúde dos estados e, principalmente dos municípios onde existe a preocupação em relação à malária devem inserir-se na construção das redes de atenção à saúde, coordenadas pela Atenção Primária à Saúde. A integração entre a Vigilância em Saúde e a Atenção Primária à Saúde é fator fundamental para a construção da integralidade na atenção à saúde, com o desenvolvimento de um processo de planejamento e prestação de serviços em saúde de acordo com a realidade local. Em relação à malária, afim de se interromper a cadeia de transmissão, as ações de prevenção e controle da doença (diagnóstico e tratamento) devem estar disponíveis em toda a rede de atenção primária nos municípios endêmicos, em conjunto com as estratégias de identificação de casos (busca ativa), além do

tratamento e educação em saúde (Brasil, 2014a). Nesse cenário, destaca-se a necessidade do trabalho conjunto – a fim de se preservar a especificidade dos setores e compartilhar as tecnologias disponíveis - entre Agentes Comunitários de Saúde (ACS), microscopistas e Agentes de Controle de Endemias (ACE) incorporadas às ações das equipes da Estratégia Saúde da Família na prevenção e combate à malária. Os ACS e os ACE possuem a vantagem de conhecerem as especificidades setoriais do município além de estarem em contato direto com a população. Esta proximidade com as comunidades deve ser o ponto de partida para uma ação integral na saúde, proporcionando informações, educação, prevenção e assistência nas populações atendidas (Brasil, 2014a). Considerando as consequências nocivas causadas pela infecção pelo plasmódio em gestantes, no ano de 2015, o Ministério da Saúde, passou a adotar como componente da Rede Cegonha o exame de rotina para malária como sendo obrigatório durante as consultas de pré-natal e no momento do parto das gestantes que vivem na Região Amazônica. Tal medida visa colaborar na redução da mortalidade maternal e neonatal mediante à proteção da gestante e do conceito contra as consequências ocasionadas pela infecção pelo plasmódio como anemia materna, baixo peso ao nascer, abortos, natimortos, partos prematuros, retardo do crescimento intrauterino e malária grave (Brasil, 2015b).

O incentivo a participação das comunidades e organizações não governamentais é fundamental para se alcançar o sucesso nos programas contra a malária (WHO, 2015a). O bom planejamento dos programas devem abordar uma boa comunicação entre os órgãos de saúde e as comunidades com o intuito de mudança de comportamento das pessoas que vivem e de informar corretamente afim de se conscientizar as localidades sobre os benefícios do combate à doença. De acordo com o PNCM, promover consciência crítica, na sociedade, a respeito do problema da malária, possibilita o planejamento e a execução de ações, de acordo com a realidade local. Quanto mais informada estiver a população, maior será a possibilidade de participar ativamente dos esforços para controle da doença (Brasil, 2014a).

2.2.6 Desafios e perspectivas na eliminação da malária

Em 2007, a pauta de eliminação da malária retornou na agenda global, estimulando iniciativas de controle e eliminação da doença por diversos países (van Eijk et al., 2016). Alguns países com taxas muito baixas de incidência autóctone de malária (geralmente em fase de pré-eliminação ou eliminação da doença) possuem considerável proporção de casos importados, muitas vezes adquiridos entre migrantes e pela mobilidade de pessoas em fronteiras internacionais. A Europa, em 2015, não registrou caso de transmissão autóctone de malária em todo seu território. A pequena quantidade de casos reportados da doença em alguns países europeus, como a Grécia, por exemplo, são classificados como casos importados. Atualmente, a Europa passa por uma crise de refugiados (pessoas que tem chance de receber asilo por fugir de perseguição, conflito ou guerra) e migrantes (pessoas que viajam em busca de melhores condições dentro do próprio país de origem). Segundo dados da OMS, cerca de 300 milhões de pessoas tentaram chegar à Europa, principalmente pela travessia no Mar Mediterrâneo geralmente fugindo de conflitos armados e perseguições étnicas em vários países principalmente no Oriente Médio e da África. Milhões de sírios, afegãos, eritreus, somalis e nigerianos, oriundos de países com transmissão local vigente de malária, tentam chegar a Europa, especialmente países de melhores condições econômicas como Itália, Alemanha e França. Os órgãos locais de vigilância em saúde nesses países estão alerta pelo fato de haver uma probabilidade maior da introdução (ou reintrodução) de doenças infectocontagiosas, como a malária, em áreas receptivas para a malária naquela região (WHO, 2016a).

Algumas áreas malarígenas tem por base em seus programas, não somente a incidência de malária localmente, mas em casos específicos, as estratégias enfatizam possíveis ameaças de insucesso no programa, como a situação da malária em áreas ou países vizinhos, especialmente em relação à mobilidade humana em regiões de fronteira internacional (“malária de fronteira”) (Castro et al., 2007). Um exemplo típico é a situação antagônica das fases de combate à malária que vivenciada por países vizinhos na América Central, o Haiti e a República Dominicana. O primeiro ocupa uma pequena porção ocidental da ilha de Hispanhola, no arquipélago das Grandes Antilhas, partilhando com a República Dominicana, sendo é o país mais pobre da América (medido pelo Índice de Desenvolvimento Humano – IDH). A violência política acompanhada de uma grave crise econômica tem ocorrido regularmente ao longo da

história do país, o que levou a instabilidade no governo. Mais recentemente, um desastre ambiental, além de um golpe de Estado originário do norte do país forçou a renúncia e o exílio do presidente da época agravaram a situação política, ambiental e econômica local. Atualmente o país se encontra na fase de controle da malária, entretanto o país concentra um alto número de casos anuais com mais da metade de sua população vivendo em áreas de alto risco de transmissão (**Figura 33**). Todos os casos reportados no ano de 2015 (17.662) foram atribuídos ao *P. falciparum*; *Anopheles albimanus* é o principal vetor nesta porção da ilha. Na fronteira terrestre encontra-se a República Dominicana, o segundo maior país do Caribe (depois de Cuba), tanto por área quanto por população, com 48.445 quilômetros quadrados e uma população estimada em 10 milhões de pessoas de habitantes. O país tem a nona maior economia da América Latina e a segunda maior economia na região do Caribe e da América Central, tendo o turismo como um ponto crucial para a economia local. Em 2015, o país registrou 496 casos de malária (99% *P. falciparum*), estão no estágio de pré-eliminação da doença em seu território (WHO, 2015a); antagonicamente ao vizinho Haiti, apenas 1% de sua população total vive em área de alto risco para a malária. Com o cenário atual na região não há como eliminar a malária no República Dominicana se não reduzir significativamente o número de casos da doença no lado ocidental da ilha (Haiti) principalmente pelo intenso fluxo de pessoas entre os dois países. Assim, o Centro Nacional para Controles de Enfermidades Tropicais (CENCET) da República Dominicana criou um plano estratégico para controlar e prevenir a malária no país. A iniciativa está sendo executada juntamente com o Haiti, com o controle do número de casos da doença, além do combate integrado a espécie vetorial comum nas duas localidades; a estratégia abrange outros setores além da saúde, como o turismo, construção civil e agricultura. Com a adoção do plano, houve uma redução de 39% no número de casos de malária na República Dominicana entre 2012 e 2013 (PAHO, 2016b).

Figura 33 - Número de casos de *Plasmodium falciparum* (2015) no Haiti (a) e na República Dominicana (b). Exemplo de cooperação entre países no combate à malária de fronteira. Adaptado de WHO (2015c)

Nos últimos anos o Brasil, especificamente o estado de Roraima enfrenta um aumento no número de casos de malária importados, muitas vezes oriundos da fronteira terrestre com a Venezuela, país este que durante esses últimos anos, enfrenta uma grave crise econômica e política, refletindo diretamente no detrimento dos serviços de saúde local causando um aumento substancial no número de casos de malária em seu território, principalmente no Estado de Bolívar (região de fronteira com a cidade, roraimense, de Pacaraíma. Somente nos primeiros cinco meses de 2016, Roraima registrou 3 mil casos de malária, sendo que deste total cerca de 50% dos casos são importados da Venezuela, segundo dados da Secretaria Estadual de Saúde (Sesau). De acordo com o órgão de vigilância do estado, a maioria das pessoas infectadas pela doença são brasileiros e estrangeiros que transitaram em regiões de garimpo no Estado de Bolívar, no sudeste do país vizinho a Roraima. Dos casos de malária registrados no estado que não são importados da Venezuela, 50% estão em áreas indígenas (Brasil, 2016).

Segundo a OMS, um dos principais desafios na luta global contra a malária é a falta de financiamento substancial, previsível e sustentando, tanto interno como internacional (WHO, 2016a). Países com transmissão de malária recebem suporte técnico e financeiro de diferentes fontes, como a OMS, Banco Mundial e outras instituições. Entretanto, a maioria dos programas de combate à malária adquirem

grande parte de seus recursos financeiros de fontes internas. Particularmente, o Brasil, desde o início dos programas de combate à malária, a maior parte dos recursos para implantação e vigência dos programas provem de fonte governamental (**Figura 34**).

Figura 34 - Fontes de investimento financeiro no Brasil destinados ao combate da malária (1990-2014). Fonte: PAHO (2014)

Na Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas, realizada na cidade de Nova Iorque, líderes mundiais se reuniram com a finalidade de adotar novas metas para o desenvolvimento global. Uma das pautas principais tinha como tema países afetados pela malária, onde se comprometeram a expandir seu compromisso na luta contra a doença. Existe uma excelente relação custo-benefício nas intervenções contra a malária onde há um dos maiores retornos do investimento na saúde pública, além de contribuir de forma significativa para a redução da pobreza (Tusting et al., 2016) e o aumento do desenvolvimento global (WHO, 2015a). Estima-se que a erradicação da malária poderia salvar 11 milhões de vidas e desbloquear cerca de dois trilhões de dólares em benefícios econômicos para os territórios afetados. Nos últimos anos, o investimento global em malária aumentou cerca de 2.000% ao ano – US\$ 130 milhões em 2000 para US\$ 2,7 bilhões em 2013. Estes recursos

transformaram fundamentalmente a luta contra a doença; mortes por malária caíram drasticamente – consequentemente, estima-se, que desde o ano de 2000, se evitou cerca de 6,2 milhões de mortes além de 663 milhões de casos novos da doença (Bill & Melinda Gates Foundation, 2016). A descontinuidade nos investimentos financeiros no combate à malária pode ter reflexos direto na prestação do serviço em saúde, tanto como na ordem técnica como organizacional, afetando negativamente o desempenho dos sistemas de vigilância, monitoramento e avaliação dos programas no combate à doença. A falta de recurso material (insumos para o diagnóstico, por exemplo) e humano podem dificultar a detecção e o tratamento da doença especialmente nas populações de difícil acesso como em comunidades recentes localizadas em áreas de assentamento agrícola na Amazônia, áreas essas que geralmente recebem migrantes de diferentes localidades do país (Barbosa et al., 2015; WHO, 2015a). A falta de novos métodos de diagnóstico para detecção da malária, especialmente em áreas de baixa transmissão da doença é outro potencial obstáculo no combate à doença (Bousema et al., 2012). A não identificação de indivíduos infectados pelo plasmódio que não apresentam sintomatologia clínica característica ou ainda, aqueles indivíduos que não são identificados pelos métodos convencionais de diagnósticos (geralmente associados à baixa parasitemia sanguínea) atuam, involuntariamente, como potenciais reservatórios da malária, contribuindo de forma significativa para a manutenção da transmissão local (referências). Atualmente, um dos pilares dos esforços a serem empregados no combate à malária é a inovação tecnológica por meio de novas ferramentas de diagnóstico para malária. Este cenário reforça a ideia de parcerias entre a comunidade científica e os órgãos gestores de saúde para o desenvolvimento de métodos mais eficazes e eficientes na detecção do parasito.

Assim como sua incidência e mortalidade, os progressos oriundos dos esforços no controle da malária evidenciam uma alta disparidade entre diferentes localidades. No ano de 2015, a República Democrática do Congo e a Nigéria contribuíram com mais de 35% das mortes ocasionadas por malária no mundo; o continente africano foi responsável por 9 dos 10 casos de malária em todo o mundo (WHO, 2016a). Outros dados preocupantes referem diretamente a condição biológica do parasito, especialmente pelas particularidades da espécie predominante na região e, do mosquito transmissor; dos 78 países que monitoraram a resistência a inseticidas no ano de 2014, 60 relataram algum grau de resistência do vetor para pelo menos um tipo do agente químico utilizado na confecção de mosquiteiros impregnados e na

borrifação domiciliar. Após o primeiro relato de resistência do parasito à artemisinina na fronteira da Tailândia com a Birmânia, há pelo menos 12 anos, desde então, novos casos têm sido reportados como no Camboja, Vietnã e Mianmar (Ashley et al., 2014). Os programas de combate à doença terão de enfrentar diversos desafios em relação a resistência de medicamentos e aos inseticidas utilizados, além de particularidades do parasito mais abundante na área. Grande número dos países que se aproximam da eliminação da malária, possuem as duas espécies de plasmódio coexistindo em seu território; entretanto é mais difícil de combater o *P. vivax* principalmente pela dificuldade de se combater as formas dormentes no fígado o hospedeiro afim de evitar recaídas da doença (Robinson et al., 2015; WHO, 2015a). Assim, para que os esforços empregados no combate à malária tenham continuidade faz-se necessário o comprometimento político, assim como o financiamento substancial e previsível e um aumento no comprometimento regional, ou seja, uma resposta conjunta e coordenada afim de se eliminar a doença em todo o mundo (Liu et al., 2013; WHO, 2016a).

2.2.6.1 Teoria convencional para a eliminação da malária

Em muitas localidades que se aproximam da eliminação da malária faz-se necessário análise dos programas implementados. A reprodutibilidade basal de uma infecção (Massad et al., 2003), denominado de R_0 , é a base para a teoria padrão da eliminação da malária. Definido como a reprodutibilidade do número de infecções secundárias esperadas oriundas de um caso infectado na ausência de controle e imunidade, ou seja, cada caso pode produzir um novo caso ao longo de todo o período de infectividade promovendo a manutenção da malária em áreas endêmicas (Chiyaka et al. 2013). Aspectos humanos no cálculo do R_0 são determinados pelo tamanho do período de infecções vigentes que podem ser sustentadas por indivíduos não tratados (por exemplo, casos assintomáticos ou infecções submicroscópicas). Aspectos vetoriais analisados no R_0 descrevem a competência vetorial, densidade populacional dos mosquitos, longevidade, hábitos pela alimentação das fêmeas, proximidade com seres humanos o que pode ocasionar certa preferência pela alimentação no hospedeiro vertebrado, além do desenvolvimento do parasito no vetor (Garret-Jones, 1964). Para se alcançar a eliminação da malária devemos alcançar $R_0 < 1$, fazendo com que cesse a transmissão local. Outra medida importante utilizada para analisar os programas de eliminação em áreas candidatas a tal evento é denominado de R_c ,

que é a probabilidade do número total de casos em um surto decorrentes de um caso importado da doença (Cohen et al., 2010). Em 2007, a OMS publicou em seu material para eliminação da malária a definição de que a eliminação da malária não necessariamente requer uma completa ausência de casos da doença em um país; casos importados podem ser introduzidos nessas localidades especialmente por meio viajantes internacionais, o que pode ocasionar a reintrodução da doença e gerar transmissão local oriunda desse caso importado (WHO, 2007). Nos dias atuais essa definição é empregada para a elaboração de diferentes estratégias em diversos países no combate à malária. O número zero para o número da incidência de casos de malária em certas regiões é dificilmente alcançado em diversos países. Assim, admite-se atualmente diversas definições para a “eliminação” da doença em diferentes localidades (Cohen et al., 2010).

Quantitativamente a diferença entre as definições de erradicação, eliminação e controle da malária reside nas diferenças entre a ausência total da incidência absoluta, números de casos próximos a zero e a baixa incidência no número de casos (Cohen et al., 2010). A eliminação em uma específica região implica na interrupção da transmissão endêmica local, porém não na ausência total de casos de malária. No Brasil, Tocantins é um típico exemplo de um estado - pertencente à Amazônia Legal – que se enquadra como uma área de eliminação de malária, já que no ano de 2015 - dos 18 casos diagnosticados no estado, todos foram classificados como importados, ou seja, não houve transmissão autóctone da doença naquela localidade (**Figura 35**) (Brasil, 2016). O conceito de receptividade implicado na transmissão da malária é descrito pela abundante presença de vetores anofelinos e a existência de outros fatores climáticos, ecológicos e sociais que podem favorecer a transmissão da malária. Vulnerabilidade é definido com base na taxa de casos importados de malária em uma determinada área, principalmente pelo influxo de indivíduos e ou grupos de infectados para essa localidade com a presença do vetor da doença. Já o potencial malarígeno de uma área é definido pela interações e efeitos da receptividade e da vulnerabilidade, podendo ser considerado como proporcional para a contagem de casos importados (vulnerabilidade) e como uma função exponencial para o grau estimado para a receptividade (densidade e espécies de vetores, fatores climáticos, ecológicos e demográficos (WHO, 2007). Se quantificado como um produto da receptividade e vulnerabilidade, esta medida expõe o número para os casos introduzidos de malária na área (Cohen et al., 2010).

Figura 35 - Padrão da distribuição dos casos de malária no Estado de Tocantins - período de 2009 a 2015. Fonte: Brasil (2016)

2.2.6.2 Vigilância (Estratégias) de controle e eliminação da malária

O cenário global da malária aponta para a necessidade de adaptação (e renovação) das estratégias utilizadas pelos programas de controle da doença, especialmente em a diminuição do número de casos, porém há um aumento na transmissão focal da doença (Bousema et al., 2012; Cohen et al., 2013; WHO, 2016a), principalmente em áreas de baixa transmissão. As campanhas implementadas em anos anteriores atualmente foram substituídas por métodos de identificação da doença que melhor atendam a realidade específica de cada local. Independentemente da característica epidemiológica da malária, alta ou baixa transmissão, diferentes trabalhos notificam que a maioria das infecções são assintomáticas, incluindo indivíduos portadores de gametócitos constituindo potenciais reservatórios do parasito (Alves et al., 2002; Barbosa et al., 2015; Laishram et al., 2012; Macauley, 2005; Medina-Morales et al., 2016). Atuar na identificação de reservatórios do parasito constituiu um dos maiores desafios dos programas que visam a eliminação da doença. A identificação e o tratamento das infecções individuais são pontos cruciais para a eliminação da doença em áreas de baixa intensidade de transmissão (Bejon et al., 2010; Sturrock et al., 2013a). A clusterização das infecções, em uma escala espacial

mais ampla, leva a distribuição em focos da doença, geralmente relacionadas com fatores ambientais, variação sazonal, capacidade vetorial e a incidência da doença. Analisando, em uma escala menor, esses focos (conhecido por “hotspots”) da doença, consistem em um domicílio ou na vizinhança (grupos de domicílios), que mantem os níveis de transmissão e constituem potenciais reservatórios de parasitos por vários anos (Bejon et al., 2010; Bousema et al., 2012, Searle et al., 2013). Estratégias que visam identificar focos de toda doença em áreas de baixa transmissão de malária podem utilizar-se de dados geografia ou de demografia para identificar esses aglomerados, visando interromper a transmissão da doença por meio da identificação e tratamento dos potenciais reservatórios (Bejon et al., 2010; Bousema et al., 2012; WHO, 2012a). De forma geral, existe uma inerente limitação nos programas de controle da malária – o sistema passivo de detecção de casos de malária, onde por iniciativa própria o paciente, geralmente febril, busca pelo sistema de saúde para o diagnóstico e posterior tratamento (WHO, 2012a). Utilizado como meio para identificar, tratar e reportar os casos individuais de infecção, sua principal limitação é a detecção exclusiva de indivíduos portadores de sintomas clínicos (geralmente casos febris). Dados atuais sobre os casos de malária reportados no Brasil, evidenciam que mais de 70% dos diagnósticos positivos para malária foram por meio de detecção passiva (Brasil, 2015b). Desde a década de 1950 há relatos na literatura biomédica que apontam a variabilidade do número de casos assintomáticos de malária, 18,4% no Japão a 90,7% em um estudo em Taiwan (WHO⁴, 1959 apud Yekutieli, 1960). Essa mesma oscilação ainda é relatado nos dias atuais em portadores assintomáticos com diagnóstico positivo para a malária, com 1,9% na Amazônia venezuelana (Peres, 1998) à 96,8% em Gana (Owusu-Agyei et al., 2002). Apesar de haver a necessidade de inovações na definição e na classificação das infecções ditas assintomáticas (de Mast et al., 2015), uma das teorias mais exploradas sobre as prováveis causas das infecções assintomáticas reside no fato de que a imunidade adquirida seja consequência de repetidas infecções pelo plasmódio (Chen et al., 2016). Todavia diferentes estudos relatam o efeito adverso na saúde de portadores infectados pelo plasmódio, porém com ausência de sintomatologia clínica, como anemia e diminuição das funções cognitivas (Chen et al., 2016; Nankabirwa et al., 2013; Wammes et al., 2013). Apesar das limitações envolvendo a amostragem de diferentes estudos

⁴World Health Organization. Expert Committee on Malaria. *Wld Hlth Org techn Rep Ser*. 1959;162.

(principalmente utilizando-se de amostras de conveniência), verifica-se que principalmente em áreas endêmicas, onde moradores dessas regiões adquirem certo grau de imunidade ao parasito (Ladeia-Andrade et al., 2009), a prevalência de portadores assintomáticos pode chegar mais de 80% dos casos identificados, como em países como Gana (Owusu-Agyei et al., 2002) e São Tomé e Príncipe (Pinto et al., 2000). Na região Amazônica brasileira observou-se uma alta proporção de infecções assintomáticas, tanto por *P. falciparum* quanto para *P. vivax*, que, em consequência de sua não identificação pela vigilância de rotina, não recebem tratamento antimalárico, contribuindo para a manutenção da transmissão local (Alves et al., 2002; Barbosa et al., 2015). Diante da evidente limitação dos serviços de combate à malária aliada as recomendações recentes da OMS visando a eliminação da malária (WHO, 2015a), diferentes estratégias que visam a detecção de casos de malária são incorporadas por diferentes programas, especialmente em áreas onde há grande número de portadores assintomáticos e o controle vetorial eficiente tornou-se de difícil implementação nessas localidades.

A busca ativa de casos – do inglês, *Active Case Detection* (ACD) – de casos de malária é geralmente utilizada como uma estratégia de identificação e tratamento da doença em diversos programas de países que objetivam a eliminação da malária (Sanders et al., 2012; WHO, 2016b). A busca ativa de casos, sintomáticos ou não, parte do reconhecimento, por agentes de saúde, de portadores do parasito em nível comunitário ou domiciliar em grupos populacionais que são considerados de alto risco (WHO, 2016b). Proposta primeiramente no ano de 1960 pelo epidemiologista Perez Yeketieli que já atentava sobre a necessidade de inovações nos métodos de detecção devido a considerável proporção de infecções assintomáticas da doença (Yekutieli, 1960). Esse tipo de busca pode ser conduzida pelo monitoramento da presença de sintomas seguido pelo método de diagnóstico de todos os indivíduos febris ou pelo exame parasitológico da população-alvo, sem uma prévia triagem clínica (WHO, 2016b). A ACD objetiva identificar todos os portadores do parasito da malária, independentemente da sintomatologia, afim de que ocorra a interrupção da transmissão local por meio do diagnóstico da malária, especialmente em portadores assintomáticos que constituem importante reservatório da infecção por não serem detectados pelas atividades rotineiras de vigilância (geralmente a busca passiva), além do tratamento (e cura) evitando-se novas infecções pelo plasmódio (Bousema et al., 2012; WHO, 2016b). Parte-se do princípio que o risco da infecção pelo plasmódio

está relacionado às características de grupo populacionais (como comunidades que residem em assentamentos rurais, por exemplo). A ACD pode ser guiada por aspectos geográficos da área ou por aspectos demográficos. A definição dos domicílios que farão parte da investigação pode incluir pessoas e domicílios em um raio de distância do domicílio onde reside o caso índice (geográfico) ou pelo monitoramento de um número aproximado de pessoas na área investigada (demográfica). A amplitude do voo do mosquito vetor (dependendo da espécie de maior implicação na transmissão) - geralmente entre 1 – 2 km - pode nortear a investigação de casos de malária em um número grande de pessoas (Abeyasinghe et al., 2012; Kunene et al., 2011; WHO, 2012a). Na prática, a decisão de se adotar um método de ACD é arbitrária para diferentes países, que levam em consideração além das questões epidemiológicas implicadas em questões de ordem política envolvendo principalmente seu custo-efetividade (Bejon et al., 2010; Littrell et al., 2013; van Eijk et al., 2016). Entretanto diferentes estratégias de ACD podem variar de acordo com a definição e o delineamento utilizado (Sanders et al., 2012), fazendo-se necessário conhecer a dinâmica da transmissão local e os fatores de risco afim de guiar a implementação de um método de ACD (Liu et al., 2013; Sanders et al., 2012; Sturrock et al., 2013a).

Desde o início dos anos de 1990 programas de diferentes países aderiram a estratégia de ACD como prioridade no combate à doença (Abeyasinghe et al., 2012; Kunene et al., 2011; Littrell et al., 2013; Premanath, 1997; Qing, 2000; Scrimgeour et al., 1999; van Eijk et al., 2016). Apesar de forma tímida, desde o ano de 1996 o Brasil tem adotado a estratégia de identificação ativa de casos de malária como método de combate à doença (Macauley, 2005). O PNCM orienta que a ACD em áreas endêmicas deve ser realizada em um raio de até 1 km de distância da residência do caso índice ou pode ser ampliada essa distância de acordo com a estrutura do sistema de vigilância local (Brasil, 2014a). Um estudo na Suazilândia, verificou que o raio de 1 km de distância utilizado na busca ativa de casos de malária constitui um grande desafio na logística do sistema de vigilância aparentando ser insustentável naquela localidade (Sturrock et al., 2013b). Com o objetivo de se implementar ferramentas na eliminação da malária em Zanzibar, a programa local utilizou a estratégia de ACD na detecção de casos para cada mil habitantes; verificou-se a necessidade da realização da ACD em aproximadamente 100 domicílios vizinhos acerca do caso índice para se

prevenir a re-emergência da malária na região (ZMCP⁵, 2009 apud Littrell et al, 2013). No Quênia, os pesquisadores verificaram que as diferentes estratégias utilizadas (detecção passiva e detecção ativa) revelaram diferentes características das infecções de malária em dois anos de estudo, sendo a ACD uma ferramenta essencial para o monitoramento e o controle da malária no país (Zhou et al., 2015).

Dois principais métodos de ACD fazem parte da rotina de diferentes países. O método de detecção ativa pode ser reativo a uma detecção passiva de um caso de malária confirmado laboratorialmente (caso índice) iniciando assim a busca ativa reativa (do inglês, *Reactive Case Detection* – RCD) de casos em uma área especificada, a vizinhança do caso índice, por exemplo (WHO, 2016b). A grande vantagem da busca ativa reativa reside na tendência de portadores da infecção estarem aglomerados no espaço e no tempo. Em um estudo transversal realizado em uma área rural do Quênia, verificou-se maior probabilidade de se detectar a malária em um determinado nas proximidades do domicílio onde reside o caso índice (Stresman et al., 2010). Diversos autores consideram a RCD como a estratégia de busca de casos ideal para áreas de baixa transmissão da malária (Stresman et al., 2010; Sturrock et al., 2013a; Littrell et al., 2013), entretanto seu alto custo pode ser um fator limitante para sua implementação (da Silva-Nunes et al, 2009). Uma alternativa para o uso da RCD em áreas com orçamento limitado é o monitoramento de áreas onde há alto risco de infecção (focos da doença) ou implementar o método em consonância com a sazonalidade referente a maior transmissão da doença na localidade. Em áreas de muito poucos casos de malária em que a transmissão aparenta não estar associada ao local (de moradia, por exemplo), a RCD pode ser realizada demograficamente, pelo monitoramento de indivíduos que compartilham fatores de risco para a doença (Sturrock et al., 2013a). Em uma área de baixa transmissão no Senegal, por meio da RCD verificou um risco de três vezes aumentado em se detectar casos entre os moradores dos domicílios índices quando comparados aos seus vizinhos. O fluxo de pessoas, especialmente para outras regiões do país, foi um fator altamente associado ao risco de se contrair a doença (Littrell et al., 2013). Em contrapartida, na Índia, por meio de uma recente revisão sistemática em relação a utilização da ACD no combate à malária naquele país, os autores concluíram que a estratégia além de desprender um grande esforço para sua aplicação em áreas de

⁵ ZMCP: Malaria elimination in Zanzibar: A feasibility assesment. Zanzibar: ZMCP; 2009.

baixa transmissão da doença, não se evidenciou seus benefícios em relação as atividades de vigilância de rotina (van Eijk et al., 2016). Outra alternativa de ACD é a busca ativa pro-ativa (do inglês, *Proactive Case Detection* - PACD) que consiste no monitoramento e tratamento de casos de malária em comunidades ou em grupos de alto risco conhecido não desencadeados pela detecção passiva de um caso índice. Sua utilização é ideal em áreas de moderada a baixa transmissão onde a sazonalidade da transmissão da malária é relativamente conhecida (WHO, 2016b), além de ser uma estratégia para se investigar populações com precário acesso aos serviços de saúde (Sturrock et al., 2013a). O método foi muito utilizado durante a década de 1960 nos programas de campanha de erradicação mundial da malária (geralmente empregadas em longos períodos). Estudos verificaram o sucesso da PACD em localidades no Brasil (Macauley, 2005) e na China (Zizhao et al., 1999) pelo monitoramento de todos os indivíduos (diagnóstico e tratamento em massa) ou somente dos casos febris (Premanath, 1997). O sucesso do PACD em reduzir a transmissão da malária está diretamente relacionado a sensibilidade do teste diagnóstico utilizado (Sutcliffe et al., 2012). A baixa sensibilidade do teste diagnóstico rápido utilizado para se detectar indivíduos infectados pelo plasmódio pode ter sido a principal causa do impacto limitado da estratégia na redução do número de casos da doença em Burkina Faso (Tiono et al., 2013). Além disso, pelo fato de ser geralmente aplicado em um amplo período de tempo, a participação da população pode estar comprometida, principalmente em áreas de baixa transmissão onde há uma ideia do baixo risco de transmissão da doença (Sturrock et al., 2013a). Em estudos transversais em três áreas rurais da Colômbia, durante os anos de 2011 a 2014, verificou-se por meio da PACD que o método convencional de diagnóstico (microscopia) detectou um número muito baixo de infecção quando comparado ao qPCR (Vásquez-Jiménez et al., 2015).

Existem inúmeros desafios para que se consiga planejar e executar uma estratégia eficaz no combate à doença. (1) O primeiro seria determinar de forma eficaz o raio que define vizinhança. Dependendo das condições ambientais e climáticas da localidade, além da estrutura do sistema de vigilância pode-se aumentar ou diminuir a distância (o raio) que se realizará a busca ativa. Em relação ao vetor, o raio de voo do mosquito anofelino pode ser utilizado para nortear a estratégia de RCD. Em áreas onde o *P. vivax* é a espécie predominante, um estudo verificou a necessidade de diferentes abordagens da RCD de acordo com as particularidades da espécie

(APMEN, 2011). Aspectos relacionados a dinâmica da transmissão da malária, como fluxo migratório e densidade vetorial devem ser considerados quando se estipula um raio ideal de cobertura para a ACD. (2) outra questão relevante seria o impacto que tal estratégia teria na transmissão da malária que está diretamente relacionada a sensibilidade e eficácia dos métodos de diagnósticos utilizados na rotina do serviço de saúde em detectar baixas parasitemias e casos de malária importada, além de questões operacionais para atingir uma cobertura ideal da área de busca e a sua relação com o custo-efetividade da estratégia. Métodos de diagnósticos utilizados rotineiramente na ACD são a microscopia sanguínea ou o TDRs. (Sutcliffe et al., 2012). Apesar desses métodos terem contribuído de forma significativa para o controle da malária, eles não são suficientes para se detectar uma proporção significativa de indivíduos assintomáticos que geralmente albergam uma baixa carga parasitária (Cook et al., 2015; Vásquez-Jiménez et al., 2016). A alta proporção de infecções subpatentes (geralmente associada as baixas cargas parasitárias que não são diagnosticadas pela microscopia e TDRs) aparenta estar relacionada a áreas onde houve um recente declínio na transmissão da doença, especialmente pelo efeito residual da imunidade adquirida pelos moradores dessas regiões (Okell et al., 2012). Atualmente admite-se que as infecções patentes são apenas a “ponta do iceberg” na cadeia de transmissão da malária (**Figura 36**), enquanto que as infecções assintomáticas atingem uma ampla proporção da população de áreas endêmicas (Alves et al., 2005; Barbosa et al., 2015; Bousema, Drakeley, 2011, Okell et al., 2012). As infecções assintomáticas são a grande proporção de infecções diagnosticadas em áreas de baixa transmissão e prováveis reservatórios da doença. Para se diagnosticar (e quantificar) esse padrão de infecções são necessários métodos alternativos de diagnósticos, como as técnicas moleculares (Cook et al., 2015; Moreira et al., 2015). Entretanto são métodos de alto custo e muitas vezes impraticáveis em áreas onde se utiliza a RCD. Uma alternativa seria o uso desses métodos moleculares para se assegurar a qualidade dos métodos convencionais de rotina (Congpuong et al., 2012).

Figura 36 - Modelo de "iceberg" para a cadeia epidemiológica da malária, principalmente em áreas de baixa transmissão.

Métodos de diagnósticos sorológicos, apesar de um custo financeiro menor em comparação as técnicas moleculares, não podem diferenciar infecções vigentes de passadas, porém o monitoramento por meio da sorologia em áreas onde a proporção de microscopia (ou TDRs) ou métodos moleculares positivos são baixos, evidências sorológicas podem ser utilizadas para se detectar grupos (ou áreas geográficas) de alto risco para a infecção ou a conversão sorológica para confirmar a ausência de infecção (Bousema et al., 2010), prever a transmissão da malária em anos subsequentes, além de auxiliar na estimação de portadores de hipnozoítos de *P. vivax* (Kim et al., 2012), especialmente em áreas de baixa transmissão da doença. A definição da população alvo é outro aspecto importante haja vista que dentro de uma área de baixa transmissão da malária, existem grupos prioritários que estão mais propensos a adquirirem a infecção. A cobertura populacional ideal, envolve o monitoramento das comunidades para se determinar o tempo que as pessoas permanecem na área, visitar novamente as pessoas que estavam ausentes e verificar a mobilidade desses participantes (Sturrock et al., 2013a). O período e a frequência da RCD deve ser analisados mediante principalmente as diferenças nos períodos sazonais e coleções de água em diferentes localidades como na região Amazônica. Torna-se imprescindível o conhecimento epidemiológico em relação a espécie de plasmódio predominante na área. Particularidades biológicas implicadas na malária vivax devem ser consideradas pois existem as recaídas tardias da doença ocasionadas por formas de hipnozoítos dormentes no fígado do hospedeiro, além de grande parte das infecções por *P. vivax* serem assintomáticas ou oligoassintomáticas, geralmente invisíveis ao sistema de vigilância de rotina, sendo assim responsáveis pela manutenção da transmissão local. Portanto, para se verificar a aplicabilidade para *P. vivax* uma eficiente RCD deve levar em consideração além das possíveis lacunas ocasionadas pela diversidade ambiental local além das particularidades biológicas da espécie na dinâmica da transmissão, como a baixa carga parasitária, alta proporção de portadores assintomáticos e as recaídas tardias (WHO, 2015a). Para a estruturação de uma RCD necessita-se conhecer a micro-epidemiologia da malária, ou seja, dentro de uma determinada área (município ou uma localidade), existem variações nos padrões de transmissão da doença. Podem existir áreas com um padrão alto/moderado de transmissão da doença (a), áreas que se caracterizam pela baixa transmissão (b) ou mesmo, (c) locais de transmissão muito baixa da doença (**Figura 37**) (Sturrock et al., 2013a).

Figura 37. Micro-epidemiologia da malária em localidades com distintos padrões de transmissão. (A) Área de alta/moderada transmissão, onde os pontos críticos de transmissão coalescem para formar um padrão mais homogêneo. (B) Risco de infecção aumenta espacialmente, diante de um único domicílio ou grupos de domicílios. (C) Áreas de malária residual. A estratégia de busca ativa reativa é indicada, principalmente para os cenários B e C. Adaptado de Sturrock et al. (2013a)

Em adição aos indicadores epidemiológicos, os programas de vigilância podem utilizarem-se de dados coletados previamente, como a identificação de indivíduos que tiveram malária nos últimos meses afim de se monitorar seu domicílio (e vizinhança) ou pessoas que compartilham os mesmos fatores de risco (WHO, 2015a). Outra ferramenta interessante de monitoramento é o uso de imagens de satélites a partir de coordenadas geográficas coletadas de domicílios onde residem casos de malária confirmado, afim de se estimar a proporção de domicílios que serão abordados pela ACD (Sturrock et al., 2013a). Uma importante limitação é a escassez de estudos para se verificar a eficácia da RCD (Sturrock et al., 2013a; van Eijk et al., 2016), além de estudos inconclusivos a respeito da eficácia da PACD (Sutcliffe et al., 2012; Tiono et al., 2013). O monitoramento e o tratamento em massa (do inglês, *mass screening and treatment* – MSAT) são campanhas que testam todos os indivíduos de uma área determinada, usualmente pela microscopia ou RDT e trata aqueles indivíduos com diagnóstico positivo. O sucesso deste modelo de estratégia está diretamente relacionado a sensibilidade do método de diagnóstico utilizado, aumentando a probabilidade de não detecção de indivíduos portadores de baixa parasitemia (Cook et al., 2015; Lindblade et al., 2013; Sutcliffe et al., 2012; von Seidlein, 2014). A não identificação de casos subpatentes pode ser a explicação mais plausível para o insucesso da campanha de MSAT por meio do teste rápido na redução da incidência de casos em áreas em fase de pré-eliminação da malária em Zâmbia (Cook et al., 2015). Outra estratégia utilizada para se incluir indivíduos infectados pelo plasmódio porém com ausência de sintomas clínicos é a campanha de administração em massa de antimaláricos (do inglês, *mass drug administration* - MDA). Um dos maiores problemas desse tipo de estratégia ocorre especialmente em áreas de baixa transmissão onde se administra medicamentos em indivíduos que não estão infectados, podendo promover uma pressão seletiva no parasito pelo uso excessivo das drogas antimaláricas favorecendo o surgimento de genótipos resistentes a esses medicamentos (Newby et al., 2015; Poirot et al., 2013).

2.3 DECRÉCIMO DA MALÁRIA NO BRASIL: O OBJETIVO DA ELIMINAÇÃO

Uma revisão recente sobre o controle das principais doenças infecciosas no Brasil coloca a malária como exemplo de sucesso apenas parcial das estratégias de controle no país (Barreto et al., 2011). A principal dificuldade para o controle da malária no final do século XX foi a migração humana maciça para a Bacia Amazônica, entre 1970 e meados dos anos 1980, incentivada pela colonização agrária e projetos de mineração. Esta região com suas particularidades ambientais e demográficas. Como consequência, observou-se uma explosão na incidência da malária, com 600 mil infecções confirmadas laboratorialmente no país em 1995. A intensificação das ações de controle no final dos anos 1990 permitiu reduzir drasticamente o número de casos; ainda assim, foram notificados cerca de 140 mil casos novos de malária em 2015 – 99,9% dos quais na Bacia Amazônica. O Brasil contribui atualmente com 37% dos casos de malária notificados nas Américas e no Caribe (PAHO, 2016a). A malária concentra-se tipicamente nos garimpos, áreas com atividade madeireira, assentamentos agrícolas, que não apenas produzem alterações ambientais maciças, como o desmatamento, que favorecem a expansão da população de mosquitos vetores, mas também atraem migrantes não-imunes a áreas repletas de criadouros naturais de vetores. Comunidades indígenas contribuem de forma significativa (> 50%) para o número de casos de malária em alguns estados, como no estado de Roraima (Brasil, 2015b).

Cerca de 85% das infecções no Brasil são causadas por *P. vivax*, indicando que a manutenção de transmissão de malária na Amazônia deve-se, em grande parte, às dificuldades de controle de *P. vivax*. Embora raramente fatal, esta espécie produz uma infecção potencialmente debilitante prejudicando a qualidade de vida e a produtividade da população de áreas endêmicas. Outro importante obstáculo para o seu controle se deve a ocorrência de recaídas decorrentes da reativação de estágio hepáticos dormentes do parasito (Mueller et al., 2009). Apesar do consenso emergente de que as ações de saúde pública precisam ser baseadas em evidências, traduzir evidências científicas em intervenções para o controle e a futura eliminação da malária em focos de transmissão residual representa um enorme desafio para o Brasil. As estratégias atuais de controle baseiam-se no diagnóstico precoce e tratamento de casos clínicos para reduzir a transmissão e morbidade; uma rede de 3500 postos de diagnóstico da malária fornece gratuitamente o diagnóstico

microscópico e o tratamento de infecções confirmadas laboratorialmente. Entretanto, o controle vetorial, e particularmente a borrifação domiciliar com inseticidas, foi gradualmente reduzido ao longo da última década, sem que se tenham validado abordagens alternativas. Um exemplo são os mosquiteiros impregnados com inseticida: embora estudos em grande escala tenham demonstrado sua eficácia na África e Ásia, a variabilidade no comportamento de picada dos vetores da malária é uma fonte de modificação de efeito que afeta seriamente a validade externa desses estudos e exige sua validação local. Uma vez que os padrões de resistência aos antimaláricos também são regionais, os medicamentos que se mostraram altamente eficazes em alguns contextos endêmicos podem falhar em outros, e também devem ser avaliados localmente (Ferreira e Castro, 2016, da Silva-Nunes et al., 2012).

Outra lacuna importante na agenda de pesquisa corresponde a estratégias eficazes para identificar e tratar reservatórios assintomáticos da infecção, especialmente em áreas com baixa incidência de malária, hoje candidatas a iniciar programas de eliminação da transmissão (Baum et al., 2016; WHO, 2012b). Quase todas as infecções maláricas no Brasil são identificadas através da busca ativa ou busca passiva de casos febris, que dependem da presença de febre para diagnosticá-las. Uma limitação séria da busca de casos febris é que as infecções assintomáticas (geralmente associadas com níveis muito baixos de parasitemia, frequentemente não detectadas pela microscopia convencional) deixam de ser diagnosticadas e tratadas (Coura et al., 2006; da Silva et al., 2010). As infecções assintomáticas são as que não se evidencia sintomas clínicos característicos da malária humana não sendo detectados formas parasitárias do *Plasmodium spp.* pelo diagnóstico de microscopia e, muitas vezes, pelo teste rápido disponíveis para uso em área endêmica. As infecções submicroscópicas são infecções que podem ser detectadas por algum tipo de diagnóstico molecular (por exemplo, exame de PCR), porém não por microscopia. Em sua grande maioria esse tipo de infecção não apresenta sintomas cínicos e não necessariamente produzem quantidades consideráveis de formas sexuadas do parasito (gametócitos) (Bousema, Drakeley, 2011; Cortter et al., 2013). Em um artigo de opinião os autores argumentam sobre a necessidade da utilização de ferramentas de diagnóstico molecular em estudos epidemiológicos em justificativa da existência de uma substancial proporção de portadores assintomáticos da infecção, além das infecções maláricas submicroscópicas que não são detectadas pelo diagnóstico convencional. Ainda, descrevem a relevância da detecção de infecções maláricas

assintomáticas e submicroscópicas para a transmissão do parasito para o mosquito e discutem as intervenções epidemiológicas com o objetivo de redução da transmissão (Bousema et al., 2014).

Estudos recentes na Amazônia brasileira (da Silva et al., 2010; da Silva-Nunes et al., 2008; Ladeia-Andrade et al., 2009) desafiam a visão clássica (MacDonald, 1957) segundo a qual a imunidade clínica (capaz de reduzir ou eliminar completamente os sintomas) raramente se desenvolve em áreas de baixa endemicidade da malária. De fato, infecções assintomáticas com baixas cargas parasitárias, frequentemente detectadas somente por técnicas moleculares, são comuns em assentamentos de fronteira e comunidades ribeirinhas da região (Alves et al., 2002; da Silva et al., 2010; da Silva-Nunes et al., 2008; Ladeia-Andrade et al., 2009). Além disso, uma vez que o espectro clínico da malária sintomática entre indivíduos semi-imunes varia de um mal-estar leve até a doença manifesta, as estratégias de ACD e PCD de casos lidam com uma doença heterogênea em que a febre e os paroxismos cíclicos nem sempre estão presentes. Em populações ribeirinhas (Ladeia-Andrade et al., 2009) e de assentamento agrícola (da Silva-Nunes et al., 2008), observa-se uma grande redução da incidência de episódios clínicos de malária depois de cinco a oito anos de exposição contínua à infecção, sem que necessariamente o número de infecções adquiridas seja menor. Na população ribeirinha do Parque Nacional do Jaú, por exemplo, para cada infecção sintomática havia cinco assintomáticas (Ladeia-Andrade et al., 2009). Mas, quando se pensa na transmissão de malária no país como um todo, a contribuição das comunidades ribeirinhas é relativamente pequena; os assentamentos em áreas de fronteira agrícola, entretanto, são hoje as grandes áreas de transmissão da doença no Brasil e deveriam ser alvo de uma busca ativa por casos assintomáticos.

A quase totalidade de indivíduos portadores de infecções assintomáticas por *P. vivax*, em um estudo prospectivo na Amazônia brasileira, apresentou gametócitos maduros na circulação (sendo, portanto, potencialmente infectantes para os mosquitos vetores) detectáveis por metodologia molecular; cerca de dois terços dos portadores de gametócitos são portadores assintomáticos de infecção (Barbosa et al., 2014). Além disso, portadores assintomáticos de infecção mostraram-se capazes de infectar mosquitos em condições controladas, ainda que com menor eficiência que os portadores de infecções sintomáticas com parasitemias mais elevadas (Alves et al., 2005). A conclusão é que mesmo indivíduos assintomáticos ou com baixas

parasitemias (muitas vezes detectadas somente por métodos moleculares) constituem um reservatório potencial de infecção. Outro problema relacionado às infecções subclínicas reside nas deficiências das técnicas de diagnóstico laboratorial empregadas. O exame de gota espessa (padrão-ouro de diagnóstico para malária) é capaz de detectar a espécie do parasito e permite a sua quantificação – sensibilidade entre cinco e 100 parasitos/ μ L de sangue. Entretanto, a limitação maior desta técnica está na precisão do resultado que está diretamente relacionado ao treinamento e à experiência do microscopista (Suarez-Mutis et al., 2007). Outros métodos de diagnósticos como os RDTs - preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil para serem utilizados quando há impossibilidade de realização do exame microscópico – possuem sensibilidade semelhante à gota espessa para *P. falciparum*, porém muito inferior para *P. vivax*, que é a espécie predominante no país (Harris et al., 2010). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) mostra-se muito mais sensível do que a microscopia convencional e os RTDs, todavia essa técnica molecular de detecção de DNA ainda é complexa e cara, tendo seu uso restrito a projetos de pesquisa (Hwang et al., 2011). Em um estudo de meta-análise, os autores compararam a eficácia da técnica de gota espessa e a PCR; observou-se que em média as gotas espessas detectam apenas 50% do que é passível de identificação pela PCR (Okell et al., 2009). Esses resultados podem indicar um quadro epidemiológico muito mais acentuado do que o exposto pelos órgãos competentes.

A escassez de evidências para apoiar as intervenções atuais no controle da malária no Brasil estimulou a execução deste projeto de pesquisa científica, com o principal intuito de estabelecer uma parceria mais sólida, entre pesquisadores e gestores, afim de enfrentar com eficácia os desafios do país no combate a malária. Assim, nosso estudo permitiu avaliar a estratégia de RCD em uma área de transmissão residual de *P. vivax* na Amazônia brasileira, candidata a eliminação da doença.

2.3.1 Reservatórios naturais de malária vivax em assentamentos da Amazônia

O município de Acrelândia, no extremo leste do estado do Acre, é um exemplo típico de malária de fronteira agrícola na Amazônia brasileira. Acrelândia originou-se de um dos grandes projetos de colonização da Amazônia, o Projeto de Assentamento Dirigido (PAD) Pedro Peixoto, estabelecido em meados da década de 1980. O município de Acrelândia, com população atual de 14.000 habitantes – 60% deles na área rural (IBGE, 2013). A situação epidemiológica atual da malária no município é bem distinta que se verificou no início da década dos anos 80 - auge da migração para a Amazônia brasileira – onde o município estava inserido em um contexto de alta transmissão de malária no país além de áreas de assentamentos agrícolas acometidos pela malária (Marques, 1987). Dados atuais registram grande queda da incidência de malária nos anos recentes, decorrente de melhorias na infraestrutura de saúde e das alterações ambientais verificadas nos assentamentos agrícolas (da Silva et al., 2010). No entanto, a malária residual continua a ser um problema de saúde pública no município, com 163 casos confirmados laboratorialmente em 2009, 248 em 2010, 104 em 2011 e 79 em 2012. Em contrapartida, houve um aumento nos casos de malária no município durante o ano de 2013 – 480 casos confirmados – sendo cerca de 95% dos casos classificados pela investigação epidemiológica de rotina do município como casos autóctones, indicando a persistência de transmissão local. Todos os casos de malária autóctones registrados no município desde o ano de 2010 devem-se a *P. vivax* (Brasil, 2015b).

As mudanças de paradigmas em relação aos desafios do objetivo da eliminação passam de medidas que visam a redução da morbidade e mortalidade (controle) para a interrupção da transmissão. Duas medidas para se diminuir a transmissão de malária incluem reduzir a taxa pela qual a infecção é transmitida entre indivíduos, ou seja, menos de um caso por pessoa infectada e, outra maneira consiste em reduzir o tempo em que o reservatório permanece infeccioso (WHO, 2016a). A eliminação desses focos residuais é o grande desafio atual para os programas de controle da malária em Acrelândia e muitas outras áreas semelhantes na Amazônia. Esse desafio requer o desenvolvimento de estratégias que não se limitem a identificar indivíduos sintomáticos (apresentando febre ou com histórico de febre recente), mas também aqueles que permanecem cronicamente infectados, porém livres de

sintomas, potencialmente infectantes para os vetores locais (da Silva-Nunes et al., 2010; Barbosa et al., 2015).

Os portadores assintomáticos podem constituir um importante reservatório de infecção, por não serem detectados pelas atividades rotineiras de vigilância. Embora não haja um consenso geral para a definição de “assintomático”, usualmente se atribui tal termo a ausência de sintomatologia clássica da malária, como a febre e outros sintomas agudos (Lindblade et al., 2013). O diagnóstico da malária baseia-se na busca passiva (do inglês, *Passive Case Detection* - PCD) e na ACD de casos febris recentes. Segundo a definição clássica, caracteriza-se a PCD quando indivíduos com sintomas procuram espontaneamente postos de diagnóstico de malária e tem uma amostra de sangue colhida e examinada por microscopia convencional. A ACD implica visitas periódicas, por equipes móveis, a todos os domicílios de uma área, com coleta e análise de amostras sanguíneas, por microscopia convencional, de todos os seus moradores com febre atual ou recente (Pampana, 1963). Em um estudo realizado no assentamento agrícola conhecido como Remansinho (Município de Lábrea, AM), a 120 km de Acrelândia, 85% das infecções maláricas diagnosticadas durante os dois primeiros anos de seguimento deixariam de ser identificadas por PCD e ACD de casos febris com base no exame microscópico convencional, em função da ausência de sintomas (especialmente febre) ou das baixas parasitemias, não detectadas pela microscopia convencional. Essas infecções não detectadas correspondem a dois terços da carga parasitária total (número absoluto de parasitos) encontrada na população (Barbosa et al., 2014). Assim como verificado no citado estudo, onde casos de malária diminuíram em até 90% nos últimos anos, um estudo transversal realizado em Papua Nova Guiné verificou altas taxas de assintomáticos (89,6%) e portadores de gametócitos de *P. vivax* (48,9% do total das infecções). Neste estudo cerca de 53% do total das infecções detectados por qPCR eram submicroscópicas e houve uma (Koepfli et al., 2015). A RCD na população exposta, independentemente da ocorrência recente ou atual de febre, é uma estratégia que permite detectar infecções assintomáticas, mas sua viabilidade é objeto de debate (Macauley, 2005; da Silva-Nunes et al., 2012). Com a redução progressiva dos níveis de transmissão de malária em áreas como Acrelândia, a relação custo-benefício dessa estratégia tende a diminuir, pois um grande contingente populacional deveria ser monitorado periodicamente para identificar um número relativamente restrito de portadores assintomáticos de infecção (WHO, 2012b). Além disso, os métodos laboratoriais

apropriados para uso em larga escala em áreas endêmicas, como a microscopia convencional e os testes imunocromatográficos de diagnóstico rápido (Moody, 2002), têm sensibilidade limitada para a detecção de baixas parasitemias típicas nas infecções assintomáticas (WHO, 2012a), especialmente aquelas causadas por *P. vivax*. Os métodos moleculares de diagnóstico representam uma alternativa de alta sensibilidade e passível de automação, mas seu custo é considerado elevado para uso em larga escala (Cohen et al., 2010; Cook et al., 2015; WHO, 2012b).

Parte das infecções assintomáticas podem, dentro de dias ou semanas após a detecção inicial, ocasionar sintomas nos indivíduos infectados (Greenwood, 1987), entretanto na maioria dos casos a infecção sem sintomas pode persistir por meses com densidade parasitária variável possuindo importante relevância na transmissão de formas sexuadas do parasito para o mosquito vetor. Tal característica na epidemiologia da malária se faz importante nos programas de eliminação da doença, principalmente em relação ao desenvolvimento de estratégias e métodos de detecção dessas formas silenciosas da infecção pelo parasito (Bousema et al, 2014; El-Moamly, 2013; Galatas et al., 2015). Geralmente a ausência de sintomas clínicos durante a infecção é acompanhada pela baixa parasitemia, especialmente em infecções por *P. vivax*. Tais infecções geralmente são de difícil detecção pelos métodos convencionais de diagnóstico aplicados tornando invisíveis para o sistema de vigilância (infecções submicroscópicas), consequentemente não há o tratamento com antimalárico nesse tipo de infecção (Chen et al., 2016; Lindblade et al., 2013). Sendo assim, para que seja maior a chance de sucesso dos programas de eliminação de malária, é crucial entender a dinâmica e transmissibilidade destas infecções submicroscópicas, particularmente em ambientes de baixa endemicidade. Em áreas de alta receptividade de malária abordagens que visam reduzir a transmissão da malária terá sucesso limitado se dependerem somente de diagnósticos de convencionais e estratégias de intervenção tradicionais, portanto sendo fundamental o monitoramento e o tratamento das infecções assintomáticas e submicroscópicas nessas áreas (Bousema et al., 2014; Waltmann et al., 2015). Assim, em áreas como a região do Município de Acrelândia, onde ocorreu significativa queda no número de casos de malária as estratégias que objetivam eliminar da doença devem basear se nos conhecimentos sobre a estimativas de prevalência, carga parasitária, portadores assintomáticos e os determinantes que auxiliam a manutenção da transmissão local. Assim, estudos são fundamentais para se determinar principalmente a rota de transmissão da malária nas

localidades pertencentes ao município afim de se planejar e executar estratégias de combate à malária na localidade.

2.3.2 Uma estratégia para direcionar a busca ativa reativa de casos (RCD)

Este projeto propõe-se a avaliar uma estratégia para identificar potenciais reservatórios em áreas com transmissão residual de malária. Baseia-se em RCD (ou seja, desencadeada em resposta à detecção de um caso confirmado [WHO, 2016b]), tendo como alvo os moradores de áreas em torno de casos confirmados de infecção, com o uso de métodos moleculares de alta sensibilidade para o diagnóstico de novas infecções, sintomáticas ou não. Estudos anteriores evidenciam um claro padrão de aglomeração espacial de casos de malária em comunidades rurais amazônicas (Castro et al., 2007; da Silva et al., 2010; da Silva-Nunes et al., 2008;) indicando que o monitoramento de potenciais focos de transmissão, que incluem domicílios com um ou mais casos da malária confirmados laboratorialmente (referidos como domicílios índices) e seus vizinhos, teria melhor relação custo-benefício para identificar novos casos assintomáticos da malária do que a busca ativa de casos na população total de áreas com baixos níveis de transmissão. A primeira etapa da estratégia de RCD consistiu na investigação epidemiológica cuidadosa de 41 casos novos de malária com confirmação laboratorial, definidos como casos índices. Todos os casos com microscopia positiva para malária, identificadas por meio de ACD e PCD, foram localizados e classificados como autóctones, recaídas, casos importados ou introduzidos (Pampana, 1963). A segunda etapa objetivou a investigação de cada foco potencial de transmissão, correspondente aos 41 domicílios índices (aqueles em que residem os casos confirmados) e seus vizinhos, em busca de outros indivíduos portadores de infecção que possam estar relacionados ao caso índice (sendo, portanto, definidos como casos colaterais).

3 HIPÓTESES CENTRAIS DE INVESTIGAÇÃO

As principais hipóteses de investigação neste estudo foram:

- a) Quando uma infecção malárica é confirmada por PCD ou ACD de casos febris agudos em uma área receptiva (ou seja, com condições propícias à transmissão), é provável que outros casos (sintomáticos ou não) ocorram em seu entorno, na mesma casa (domicílio índice) ou na vizinhança, estabelecendo um foco de transmissão;
- b) O monitoramento sistemático de moradores de focos potenciais de transmissão, com métodos diagnósticos de alta sensibilidade, pode identificar uma maior proporção de potenciais reservatórios da infecção em áreas de baixa endemicidade do que os inquéritos populacionais da população geral;
- c) Há um aumento na probabilidade de infecção na proximidade dos casos índices persistirem após os primeiros meses, principalmente pelas recaídas por *P. vivax*;
- d) genotipagem parasitária pode determinar os elos epidemiológicos entre as infecções identificadas pela RCD.

4 OBJETIVO

Este projeto tem como objetivo implementar e avaliar uma estratégia para detectar portadores sintomáticos e assintomáticos do parasito (potenciais reservatórios de infecção) em áreas de transmissão residual de malária, centrada no monitoramento de potenciais focos de transmissão em torno de episódios clínicos (casos índices) diagnosticados por PCD ou ACD.

4.1 ESPECÍFICOS:

- a) Classificar todos os casos índices detectados por *PCD* ou *ACD* e confirmados laboratorialmente no município de Acrelândia, ao longo de 12 meses, como casos autóctones, recaídas, casos importados ou casos introduzidos;
- b) Avaliar a prevalência de casos detectados dentro e fora do foco de transmissão combinando a microscopia convencional e o diagnóstico molecular, comparando os resultados de monitoramento do domicílio índice e seus vizinhos (dentro do foco potencial de transmissão) com aqueles obtidos em domicílios não-relacionados (fora do foco potencial de transmissão) preferencialmente pertencentes à mesma localidade;
- c) Comparar a proporção de casos identificados no diagnóstico molecular em relação ao método convencional de microscopia;
- d) Analisar a periodicidade da *RCD*;
- e) Avaliar a aplicabilidade da estratégia para o *Plasmodium vivax*;
- f) Determinar os elos epidemiológicos entre as infecções maláricas diagnosticadas por meio da genotipagem dos parasitos obtidos durante o monitoramento dos focos potenciais de transmissão.

5 MÉTODOS E DELINEAMENTO EPIDEMIOLÓGICO

Este é um estudo de painel com agregados familiares como unidade amostral. Para a avaliação a estratégia de RCD, a comparação primária envolveu domicílios dentro e fora de um foco potencial de transmissão de malária. O foco potencial de transmissão foi definido em torno do domicílio (definido como domicílio índice) em que residem um ou mais indivíduos com malária confirmada laboratorialmente no município de Acrelândia entre os meses de janeiro a dezembro de 2013.

Para efeitos de monitoramento, o foco potencial de transmissão compreende, além dos 41 domicílios índices, os cinco domicílios mais próximos a ele (domicílio vizinho) – 205 domicílios – (em um raio <3 km em torno do domicílio índice). A média de distância para esses domicílios foi de 731 metros (m) (amplitude de 13 m a 2.980 m). Os domicílios fora do foco potencial de transmissão a serem monitorados foram cinco domicílios selecionados aleatoriamente (205 domicílios) entre aqueles situados a mais de 5 km do domicílio índice (domicílio controle), preferencialmente pertencentes à mesma localidade. O raio de 5 km foi definido com base na capacidade de dispersão espacial de *Anopheles darlingi* (Charlwood, Alecrim, 1989; Alves et al., 2005). A média de distância desses domicílios para os domicílios índices foi de 12.000 m (amplitude de 5.017 m a 20.000 m) (**Figura 38**). Todos os habitantes de cada domicílio incluído no estudo foram convidados a participarem do estudo; em caso de recusa, foram convidados os moradores da casa mais próxima dentro da mesma localidade. Quando à localidade não possuía potenciais domicílios controles a participarem do estudo no raio de distância estipulado pelo grupo de pesquisa, foram selecionados domicílios das localidades adjacentes com características ambientais semelhantes aos seus respectivos domicílios índices. A literatura clássica define localidade como uma área circunscrita e eco-epidemiologicamente homogênea, tipicamente com 100-400 residências, que possui os elementos epidemiológicos necessários para a transmissão da malária (Pampana, 1963). Nossa estratégia de busca se baseou nas denominações de localidade utilizada pela Gerência de Vigilância e Controle de Endemias de Acrelândia para suas atividades de controle de malária no município.

Figura 38 - Delineamento do estudo. Visitas no dia 0, 30, 60 e 180 dias após a visita inicial.

5.1 ÁREA DO ESTUDO

Acrelândia (latitude: 09°43'40"S; longitude: 66°52'58"W), a “Princesinha do Acre”, é um município com uma população de 12.538 habitantes, sendo 53% do sexo masculino (IBGE, 2010). Foi criado no ano de 1993 no extremo leste do estado do Acre pelo desmembramento dos municípios acreanos de Plácido de Castro e Senador Guimard, cujo nome foi dado pelo Pioneiro João Bernardo Parente, caracterizando a primeira cidade projetada do Estado do Acre. A origem do município está baseada em Projetos de assentamentos estaduais na década de 1980, efetuado por meio do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), COLONACRE e da Companhia de Desenvolvimento Agrário. Na época foram implantadas as primeiras infraestruturas para demarcação de lotes, construção de habitações, implantação de seringais e cultivo de cacau consorciados com a agricultura familiar. Obteve sua autonomia com o Decreto nº 1025 de 28 de abril de 1992, pelo então Governador Edmundo Pinto de Almeida Neto sendo elevado à categoria de município e distrito com a denominação de Acrelândia, pela lei estadual nº 1025, de 28-04-1992, alterado em seus limites pela lei estadual nº 1060, de 09-12-1992. Seguindo a mesma tendência do Estado do Acre, Acrelândia praticamente duplicou sua população entre o período dos anos de 1996 (6.267 habitantes) a 2010 (12.538 habitantes) (IBGE, 2015).

Com um clima úmido equatorial (pela Classificação de Köppen), com os maiores índices pluviométricos entre os meses de dezembro a março e temperatura média anual de 24,5 °C (variando de 24,5 °C a 32 °C), o município ocupa uma área de 1807,957 km² (densidade demográfica de 6,94 habitantes/km²) entre os rios Abunã e Iquiri, na mesorregião do Vale do Rio Acre. Geralmente ocorrem duas estações distintas: uma seca e uma chuvosa. A primeira, que se inicia no mês de maio prolongando-se até o mês de outubro, desaparecendo as chuvas, sendo comuns as “friagens” resultantes do avanço de uma Frente Polar impulsionada por uma Massa de Ar Polar Atlântica que avança pela Planície do Chaco até a Amazônia Ocidental provocando queda de temperatura de até 10 °C. A estação chuvosa, ocorre geralmente de novembro a abril, sendo caracterizada por chuvas constantes e abundantes. A umidade relativa do ar atinge 90%, com índices pluviométricos variando de 1.600 mm a 2.750 mm/ano. O Município limita-se ao sul e sudoeste com o município de Plácido de Castro, ao oeste com Senador Guimard, e ao norte com

os estados do Amazonas e Rondônia, além da fronteira internacional ao leste com a República da Bolívia (**Figura 39**). Trata-se de uma área típica agrícola, com acesso principal a Rio Branco e ao restante do país pela Rodovia BR-364 e, também pela rodovia Estadual AC-457 (“Estrada do Agricultor”), ambas de grande importância tanto para o fluxo de pessoas como para o escoamento de produtos agrícolas. O município foi povoado por famílias de agricultores provenientes, principalmente, das regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil, participantes de projetos de colonização do INCRA (IBGE, 2010). Atualmente o município conta com um total de 9 projetos de assentamento gerenciados pelo INCRA e um projeto de assentamento criado e gerenciado pelo estado, na sua maioria criado no início dos anos de 1990 (Brasil, 2015a). A base econômica local baseia-se na agricultura familiar, pecuária extensiva e lavouras permanentes (principalmente café e banana), além da extração de madeira e da castanha-do-Brasil (**Figura 40**). O Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) de 0,604 estando entre os melhores do Estado do Acre, porém abaixo da média nacional (IDH – Índice de Desenvolvimento Humano - de 0,775) (IBGE, 2014). No ano de 2012, dados do censo realizado pelo IBGE apontaram que o município possuía 8 estabelecimentos de saúde com atendimento pelo SUS. Entretanto, no ano de 2013, Acrelândia contava com apenas dois postos de atendimento para diagnóstico de malária e leishmaniose, sendo um na área rural - Posto de Saúde “Altina Magalhães”, às margens da BR-364 próximo à divisa estadual com Rondônia (distrito de Nova Califórnia, Município de Porto Velho) e Amazonas – município de Lábrea, com horário de funcionamento somente no período da manhã e o outro laboratório de diagnóstico localizado no Centro de Saúde na área urbana do município com funcionamento em período integral.

Figura 39 - Mapa mostrando a localização do município de Acrelândia, no estado do Acre. (Distante a 120 km de Rio Branco, capital do Acre e a 35 km de Plácido de Castro, cidade na fronteira entre Brasil e Bolívia, onde localizava-se o laboratório de campo mantido pela Universidade de São Paulo que deu suporte a este projeto)

Figura 40 - Principais atividades desenvolvidas no Município de Acrelândia, extremo leste do estado do Acre.

As localidades abordadas em nosso estudo provêm de projetos de assentamentos agrícolas implementados pela União no início dos anos 70. Diferentes momentos e modelos de assentamento caracterizam a origem dessas áreas de povoamento (**Figuras 41, 42, 43 e 44**) (Brasil, 2015a). Algumas localidades participantes do estudo são oriundas de um tipo específico de projeto de assentamento – Projeto de Assentamento Dirigido (PAD) – implementados pelo governo federal no início dos anos de 1970. O principal objetivo desses assentamentos era o cumprimento do Estatuto da Terra, em relação aos assentamentos de pequenos e médios agricultores, com vigência do regime familiar de propriedade. Trata-se de projetos criados e titulados pela União visando a regularização de glebas rurais sob sua posse. Outro modelo de assentamento participante são os Projetos de Assentamentos Federal (PA) oriundos de um conjunto de ações planejadas em áreas pertencentes à União destinadas a reforma agrária. A localidade criada em decorrência de Projeto de Assentamento Agroextrativista (PAE), conhecida como PAE Porto Dias (criado em 20/10/1989), caracteriza-se de uma modalidade de assentamento destinado à exploração das riquezas extrativistas da área de maneira sustentável pelas populações que lá residem. No município, essa localidade tem suas particularidades pois seus moradores ainda residem em uma área onde está presente grande parte da floresta nativa amazônica pertencentes ao município, além de ser umas das fronteiras (pelo Rio Abunã) com a República da Bolívia servindo de rota para a colheita da castanha-do-Brasil, além de atividades predatórias como a caça e a pesca. Por fim, e mais recentemente foi criada no município de Acrelândia uma área de Assentamento na modalidade de Projeto de Desenvolvimento Sustentável (PDS), na qual se caracteriza como projeto criado para o desenvolvimento de atividades ambientalmente diferenciadas, destinadas às populações que baseiam sua subsistência no extrativismo, na agricultura familiar e em outras atividades de baixo impacto ambiental. Em todas essas áreas de assentamento agrícola previamente especificadas o apoio a produção, a infraestrutura básica e a titulação (Concessão de Uso/Título de Propriedade) são de responsabilidade do INCRA. A área de assentamento conhecida por “PE Redenção” é uma área de assentamento rural criada como um modelo de Projeto de Assentamento Estadual (PE) onde a obtenção da terra, criação do Projeto, seleção dos beneficiários e a titulação é de responsabilidade das Unidades Federativas (Modalidades de áreas reconhecidas pelo INCRA, [Brasil, 2015a]). Ações de controle

vetorial, como a utilização da borrifação intradomiciliar com inseticidas de ação residual (implementada no ano de 2008) e a distribuição e o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração (MILD), desde 2010, foram as principais ferramentas que contribuíram de forma significativa com a redução da malária (e a virtual eliminação do *P. falciparum*) no município (Ferreira, Castro, 2016). Entretanto, com a significativa redução dos casos de malária no município de Acrelândia, o combate vetorial passou a ser utilizado como um método complementar do controle da malária local, como por exemplo, a borrifação domiciliar em residências de localidades onde há um maior número de casos confirmados, em um determinado período do ano. O *Anopheles darlingi* é o vetor de malária predominante nessas localidades (Sinka et al., 2010). Inquéritos entomológicos recentes revelaram que essa espécie representa mais de 90% dos anofelinos coletados em uma área rural denominada PAD Pedro Peixoto (Moitinho et al., 2011), entretanto, habitats contendo larvas de *An. benarrochi* s.l., *An. oswaldoi* s.l. e *An. konderi* s.l. foram identificados da região (Sallum et al., 2008).

Figura 41 - Mapa (escala 1 / 150.000) mostrando a localização e a divisão de lotes para os ocupantes do PAE Porto Dias realizada pelo INCRA em uma área de 22.145 ha no Município de Acrelândia. Fonte: Brasil (2015a)

Figura 42 - Mapa (escala 1 / 150.000) mostrando a localização e a divisão de lotes entre os ocupantes do PDS Gleba Porto Luís realizada pelo INCRA em uma área de 25.000 ha no Município de Acrelândia, Acre. Fonte: Brasil (2015a)

Figura 43 - Mapa (escala 1 / 140.000) mostrando a localização e a divisão de lotes para os ocupantes do PDS Gleba Porto Luís realizada pelo INCRA em uma área de 9.900 ha no Município de Acrelândia.
Fonte: Brasil (2015a)

Figura 44 - Visualização das áreas de assentamentos rurais participantes do estudo, 2013, Município de Acrelândia, Acre. (PTL = PDS Porto Luiz; PTD = PAE Porto Dias; SJB = PA São João do Balanceio; SAP = PA Santo Antônio do Balanceio; ORI = PA Orion; RED = PE Redenção; PEP = PAD Pedro Peixoto).

5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

No final do mês de janeiro de 2013 iniciamos a fase de coleta de dados de um estudo de painel por meio da RCD na área rural do município de Acrelândia.

Similarmente ao ocorrido em praticamente toda a região amazônica, há uma relação entre a sazonalidade com o aumento no número de casos de malária detectados no município em um período após a estação chuvosa na região - entre os meses de abril a julho (**Figura 45**). Acrelândia registrou grande queda da incidência de malária nos anos recentes: no ano de 2009 foram registrados 163 casos por diagnóstico de microscopia de lâmina de gota espessa, 2010 com 248 indivíduos infectados, 2011 foram registrados 85 casos e, no ano de 2012 houve o relato de 76 casos de malária. Apesar *P. falciparum* e *P. vivax* de coexistirem na região no início dos anos 2000, desde o ano de 2010 apenas *P. vivax* é relatado como responsável pela transmissão autóctone de malária. Entretanto, houve um aumento nos casos de malária no município durante o ano de 2013 - 480 casos confirmados, sendo que 258 casos foram diagnosticados por PCD e 222 por ACD. Da totalidade desses casos, 95% foram classificados, pelo Centro de Vigilância e Controle de Endemias do município, como autóctones evidenciando que a malária ainda persiste como um problema de saúde pública no município (**Figura 46**). Todos os casos de malária notificados neste ano foram causados por *P. vivax* (Brasil, 2015b). Atualmente o município possuiu dois laboratórios ativos para o diagnóstico de malária (um na área rural e o outro na área urbana sediado na Unidade Básica de Saúde do município). Uma propriedade rural conhecida por “Fazenda Jéssica” foi responsável por cerca de 26% dos casos total de malária no ano de 2013 no Município de Acrelândia. Tratava-se de uma área de disputa por terras. A ocupação desta propriedade rural – situada às margens da Rodovia BR-364 (com acesso principal na altura do km 106) – por pessoas de diferentes cidades e estados do Brasil se intensificou no início do mês de janeiro de 2013 até o momento de sua desocupação (determinada por ordem judicial), em novembro do mesmo ano; nesse período havia na área cerca de 200 famílias em sistema de acampamentos em moradias não fixas, a maioria delas improvisadas como barracos de lona (dados não publicados, Gerência de Vigilância e Controle de Endemias de Acrelândia). Com altos índices de casos de malária a localidade apresentava grandes dificuldades de acesso para os agentes de endemias devido à ausência de estradas principalmente na época de chuvas intensas na região. Assim,

em diversas situações, não foi possível acompanhar tanto o tratamento como a evolução da doença em indivíduos com diagnóstico confirmado, onde grande número de indivíduos diagnosticados com malária abandonava seus acampamentos na área com o objetivo de retornar à localidade de origem ou procurar melhor assistência na cidade de Acrelândia ou na capital do estado, Rio Branco. Apesar do apoio de nossa equipe de trabalho aos agentes de endemias municipais no diagnóstico, tratamento e levantamento dos casos de malária, essa área rural não fez parte da amostragem de nosso estudo devido, principalmente, a dificuldade de seguimento dos indivíduos pois não havia uma expectativa de tempo de permanência dos mesmos na localidade, além do fato de não possuírem residência fixa dentro da área o que certamente inviabilizaria a análise dos focos de transmissão.

Figura 45 - Frequência mensal de casos de malária vivax notificados para malária, 2013, Município de Acrelândia, Acre. Fonte: Brasil (2014).

Figura 46 - Casos positivos notificados para malária entre o período de 2009 a 2015, Município de Acrelândia, Acre. Fonte: Brasil (2015b).

A investigação epidemiológica em nosso estudo foi desencadeada pela detecção de 41 casos novos de malária diagnosticados por PCD ou ACD localizados em diferentes áreas no município do município durante o ano de 2013 (**Tabela 3**). Esse número representou cerca de 21,9% do total de casos elegíveis diagnosticados pelo sistema de vigilância municipal entre o período dos meses de janeiro e julho de 2013 (Brasil, 2013) (**Figura 47**). Nos 41 domicílios índices (local de residência do caso índice) havia 202 moradores; nos 205 domicílios vizinhos (< 3 km do domicílio índice) foram recrutados 876 indivíduos e, nos 205 domicílios controles (> 5 km do domicílio índice) 852 moradores participaram do estudo. Casos índices, demais moradores dos domicílios índices (**Figura 48**), moradores dos domicílios vizinhos foram recrutados em todas as localidades, exceto para PEP; cerca de 53,7% do total de casos índices residiam na localidade Porto Luiz (PTL).

Tabela 3 - Casos índices segundo suas respectivas áreas de assentamento e localidades* de moradia, Acrelândia, Acre, 2013.

Áreas de Assentamentos agrícolas ^a	Localidades ^b (% pelo total das colunas)	Caso Índices (N=41)	
		n*	%
PDS Porto Luiz	Gleba Porto Luiz I	17	41,5
	Gleba Porto Luiz II	5	12,2
PA Santo Antônio do Peixoto	Santo Antônio Peixoto	4	9,8
	Seringal Triunfo	1	2,4
PA São João do Balanceio	São João do Balanceio	2	4,9
PE Redenção	Redenção	2	4,9
	Nossa Senhora Rainha da Paz	1	2,4
PA Orion	PA Orion	3	7,3
PAE Porto Dias	Reserva Porto Dias	6	14,6

^aModalidades de Projetos de Assentamento criados em implementados no Município de Acrelândia pelo INCRA.

^bLocalidades definidas de acordo com a classificação utilizada pelo Centro de Vigilância e Controle de Endemias para planejamento e execução das atividades de combate à malária do Município de Acrelândia, Acre.

Figura 47 - Número de casos índices (n = 41) em comparação aos casos elegíveis notificados com malária vivax, 2013, Município de Acrelândia, Acre. Fonte: Brasil (2013)

Participantes do estudo estavam distribuídos em 7 localidades do município de Acrelândia: Gleba Porto Luiz (PTL), Projeto Santo Antônio Peixoto (SAP), Projeto São João do Balanceio (SJB), Projeto Redenção (RED), Projeto Orion (ORI), Reserva Porto Dias (PTD) e Projeto Pedro Peixoto (PEP) (**Figura 49**).

Figura 48 - Localização geográfica dos casos índices que desencadearam a RCD, 2013, Município de Acrelândia, Acre. (PTL = PDS Porto Luiz; PTD = PAE Porto Dias; SJB = PA São João do Balanceio; SAP = PA Santo Antônio do Balanceio; ORI = PA Orion; RED = PE Redenção; PEP = PAD Pedro Peixoto).

Figura 49 - Localização dos diferentes tipos de domicílios participantes no estudo, Município de Acrelândia, Acre, 2013. (PTL = PDS Porto Luiz; PTD = PAE Porto Dias; SJB = PA São João do Balanceio; SAP = PA Santo Antônio do Balanceio; ORI = PA Orion; RED = PE Redenção; PEP = PAD Pedro Peixoto).

Um termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexos A e B**) para participação voluntária foi coletado dos pais e/ou responsáveis pelas crianças antes do recrutamento, com a garantia de sigilo das informações prestadas, acesso aos resultados do estudo e possibilidade de recusar participação a qualquer momento sem nenhum prejuízo. Depois de o estudo ser totalmente explicado e o consentimento informado ser obtido de cada indivíduo ou seus pais/responsáveis, um número de identificação do indivíduo foi atribuído a cada participante. Em todas as fases do trabalho de campo no município de Acrelândia, a equipe de pesquisa identificou-se devidamente durante as visitas domiciliares e expôs objetivos, metodologia, riscos e benefícios do estudo. Indivíduos, com idade inferior a três meses, os que não tinham planos de permanecer na localidade ao longo dos próximos seis meses, ou pessoas que se recusaram a fornecer o consentimento informado por escrito, não foram recrutados no estudo. O protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (parecer 1105/CEP, 25/03/2013).

5.2.1 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para casos índices foram:

- a) apresentar malária confirmada laboratorialmente;
- b) residir no município de Acrelândia;
- c) ter idade > 3 meses de idade e;
- d) fornecer consentimento informado por escrito.

Os indivíduos que compartilham a residência com um caso índice, bem como aqueles que vivem em domicílios vizinhos selecionados para o estudo e em domicílios não-relacionados selecionados foram recrutados se preencheram os seguintes critérios:

- a) ter idade > 3 meses de idade;
- b) ter planos de permanecer na localidade ao longo dos próximos seis meses e;
- c) fornecer consentimento informado por escrito.

5.2.2 Identificação dos focos de transmissão e visitas de seguimento

Questionários padronizados (**Anexos C, D e E**) foram aplicados para todos os participantes do estudo para a coleta de informações. Questionário de nível domiciliar contendo informações sobre localização geográfica do domicílio, classificação do domicílio em relação à distância para o caso índice (índice, vizinho ou controle) e número de moradores e, questionários de nível individual contendo informações como idade, sexo, local de nascimento, tempo de moradia na Amazônia, tempo de ocupação na área, tempo de residência no domicílio, hábito de dormir próximo ao rio, hábito de caça e de pesca, frequência de atividade no interior da mata, deslocamentos para outras localidades, uso de medidas de proteção contra o vetor (uso de mosquiteiro, por exemplo), histórico de malária durante a vida, além de episódios recentes de malária (últimos seis meses) e de presença de sintomas clínicos nos últimos 7 dias anteriores à visita. Foram classificados como indivíduos sintomáticos os que apresentavam febre (temperatura corpórea $> 37,5^{\circ}\text{C}$) ou histórico recente de febre (7 dias anteriores à visita), relatos de cefaleia, mialgia, artralgia e ou lombalgia. A média, frequência e os intervalos de confiança foram verificados. A localização de todos os domicílios foi determinada com sistema de posicionamento global portátil (*Garmin eTrex*, EUA, com precisão de 10 m). O cálculo das distâncias entre os domicílios foi realizado com auxílio de um programa computacional “calculadora geográfica” (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2013).

Após a entrevista domiciliar, os moradores foram convidados a fornecerem amostras de sangue capilar para a confecção de lâminas de gota espessa e coleta do material em cartão de FTA. Do indivíduo índice foi coletada uma amostra de sangue por punção venosa para confirmar o diagnóstico da malária por microscopia de gota espessa e método molecular (reação em cadeia da polimerase [qPCR]) e genotipar os parasitos. A entrevista permitiu classificar os casos índices como autóctones, possíveis recaídas e casos importados, baseando-se no histórico do indivíduo para malária recente e deslocamentos para outras áreas. Todos os moradores > 3 meses de idade do mesmo domicílio dos casos índices, aqueles residindo nos cinco domicílios vizinhos mais próximos (em um raio de distância < 3 km do domicílio índice) e aqueles que residiam em cinco domicílios controles, escolhidos aleatoriamente entre aqueles situados a mais de 5 km de distância do domicílio índice, preferencialmente na mesma localidade, foram entrevistados e convidados a fornecerem uma amostra

de sangue capilar por punção de polpa digital, para o diagnóstico de malária por microscopia de gota espessa e qPCR, independentemente de apresentarem ou não alguns sintomas clínicos da doença. No caso de diagnóstico positivo, os parasitos foram genotipados para comparação com aqueles encontrados no caso índice. Houve a tentativa de reavaliar todos os indivíduos recrutados em três ocasiões: 30 (± 5), 60 (± 5) e 180 (± 10) dias após a primeira visita. Os seguimentos objetivaram maximizar a probabilidade de identificar infecções simultâneas ao caso índice (visita 0), casos secundários aos casos índices ou outras infecções não identificadas no recrutamento (visita 30 dias), novas infecções originadas dessas infecções secundárias (visita de 60 dias) e, na tentativa de identificar possíveis recaídas, baseado no padrão temporal para malária vivax descrito no Brasil (Boulos et al., 1999). Amostras de sangue foram colhidas, por punção de polpa digital, em todas as visitas de seguimento, para o diagnóstico da malária e a genotipagem parasitária (caso houvesse infecção). Durante as visitas domiciliares, em relação aos indivíduos que não estavam presentes na residência, houve por parte da equipe de campo uma nova tentativa de encontrá-lo. Nos diferentes seguimentos caso houvesse “novos moradores” presentes nos domicílios participantes, estes foram convidados a participarem do estudo desde que atendessem os critérios de inclusão (**Figuras 50 e 51**).

Os registros de casos de malária diagnosticados pela Gerência de Vigilância e Controle de Endemias de Acrelândia durante todo o período de estudo foram examinados diariamente para detectar episódios adicionais da malária, entre os participantes dos inquéritos, diagnosticados por PCD e ACD de casos.

Figura 50 - Desenho epidemiológico do estudo, 2013, Município de Acrelândia, Acre.

Figura 51 - Estratégia de Busca Ativa Reativa (RCD), 2013, Município de Acrelândia, Acre. Fotos: Alessandra Fratus

5.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Todos os procedimentos de campo e laboratoriais foram executados por profissionais de nível superior da área biomédica. As amostras sanguíneas coletadas dos casos índice (por punção venosa) e dos participantes (por punção de polpa digital) foram utilizadas para o preparo de 6.023 lâminas de gotas espessas, coradas com solução de Giemsa e examinadas no laboratório situado na área urbana de Acrelândia. Uma alíquota do material coletado foi transferida para membranas adequadas para a preservação de DNA (FTA, Whatman, Clifton, EUA), identificadas com o número do indivíduo e armazenadas individualmente, à temperatura ambiente, em sacos de plástico selados com dessecante até seu envio ao laboratório em São Paulo para extração do DNA (até um mês após a coleta) (**Figura 52**). Alíquotas do sangue venoso colhido dos casos índices foram também utilizadas com as seguintes finalidades: (a) realizar uma contagem completa de células sanguíneas, em contador de células automatizado (Micros 60, Horiba, França) disponível em nosso laboratório de campo, (b) criopreservar o isolado de *P. vivax* para futuros estudos fenotípicos in vitro.

Figura 52 - Coleta de sangue capilar para confecção da lâmina de gota espessa e cartão de FTA.

5.4 MEDIDAS DOS PARÂMETROS PRIMÁRIOS E DAS VARIÁVEIS DE CONFUSÃO

Para o diagnóstico da infecção, as preparações de gota espessa foram coradas com Giemsa e examinadas com objetiva de imersão (aumento total, 1000 vezes) por dois microscopistas locais com experiência no diagnóstico de malária. Pelo menos 100 campos microscópicos de grande aumento foram examinados em cada preparação. Quando houve dúvida no resultado de alguma lâmina de gota espessa, o exame era revisado por um terceiro microscopista. Todos os casos de infecção malárica diagnosticados por microscopia ao longo do estudo, sintomáticos ou não, foram tratados por funcionários da Gerência de Vigilância e Controle de Endemias de Acrelândia com base na última edição do Manual de Terapêutica de Malária editado pelo Ministério da Saúde (MS, 2010).

O diagnóstico molecular foi realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Malária da Universidade de São Paulo, segundo o protocolo descrito em Gonçalves et al. (2012). A extração do DNA do parasito se deu em três discos de 3 mm obtidos de membranas do FTA (Whatman® FTA®, Sigma-Aldrich, por meio de um microperfurador Harris, com o *microkit* DNA QIAamp (Qiagen, Valencia, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Com base em informações fornecida pelo fabricante do cartão FTA o volume máximo de sangue contido no cartão é de 125 µl em uma área de 490,625 mm². Como o disco extraído possui diâmetro de 3 mm, calculamos a área desse círculo a partir da área do cartão de FTA (Área = 7,065 mm²). Em seguida, fizemos a relação entre área e volume, concluindo que o volume de sangue capilar contido em cada disco de 3 mm é de aproximadamente 5,4 µl.

Uma plataforma automatizada (QIAcube, Qiagen, Alemanha) foi usada para a extração de DNA, sendo o material extraído armazenado a -20°C até seu uso para diagnóstico molecular de malária e (quando aplicável) genotipagem parasitária. O diagnóstico molecular é baseado em qPCR tendo como alvo um segmento espécie-específico do gene que codifica a subunidade menor (18S) de RNA ribossômico (rRNA) de *P. vivax* e *P. falciparum* e como indicador de amplificação o fluorocromo SYBR Green. Cada 20 µL da mistura da reação compreendia 2 µL de amostra de DNA extraído e ressuspendido, 10 µL da mistura comercial SYBR Green (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e 0,5 µM do iniciador comum P1, gênero-específico (ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT), combinado com um dos iniciadores espécie-específicos, V1 (CAA TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A) ou F2 (CAA TCT AAA AGT CAC

CTC GAA AGA TG) para *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente. Esses iniciadores permitem à amplificação de fragmentos de aproximadamente 100 pares de bases do gene *18S rRNA* (Kimura *et al.*, 1997). As parasitemias foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão preparada com diluição seriada de uma solução de plasmídeos recombinantes contendo as sequências-alvo de cada espécie (**Figura 53**).

O procedimento de amplificação do fragmento diagnóstico do gene *18S rRNA* ocorreu por meio de um termociclador Mastercycler Realplex S (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com o seguinte programa: uma etapa inicial a 50 °C (2 min), desnaturação da fita molde a 95 °C (10 min), seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (seg) e 60 °C por 1 min (com aquisição de fluorescência no final de cada etapa da extensão), extensão final a 95 °C por 15 seg e 60 °C por 15 seg a 60 °C e a cada etapa um aumento na temperatura de 0,03 °C/s até atingir 95 °C, com aquisição de fluorescência para cada transição da temperatura.

O limite da acurácia na quantificação por qPCR foi de 1,49 amplicons/ μ l de sangue. Para a quantificação da parasitemia de formas sanguíneas circulantes de *P. vivax* foi considerado a média aproximada de três genomas por parasito (3,3 parasitos/ μ l de sangue). Os resultados foram expressos em parasitos/ μ l de sangue venoso ou capilar (**Figura 54**).

Figura 53 - Quantificação da carga parasitária sanguínea. A quantificação foi realizada a partir da curva de diluição. Utiliza-se plasmídeos clonados com concentração conhecida. A alíquota estoque é de 25 ng/μl. A curva é diluída (1:10) a partir da alíquota estoque.

Figura 54 - Exemplo de curva-padrão, obtida em qPCR, utilizada para a quantificação de parasitemias de *Plasmodium vivax*. Na parte superior são mostrados os valores de fluorescência a cada ciclo de amplificação, enquanto na parte inferior da figura evidencia-se a curva padrão obtida com esses dados.

5.4.1 Definições clínicas e tratamento

Infecção confirmada de *P. vivax* foi definida como um episódio de parasitos sanguíneos detectados por microscopia, qPCR ou ambos os métodos. Infecções subpatentes foram definidas quando o qPCR confirmou a infecção, porém a microscopia foi negativa para *P. vivax*. Malária sintomática foi classificada como uma infecção laboratorialmente confirmada (independente da carga parasitária) em um participante que reportou um ou mais sinais e sintomas investigados (febre, cefaleia, mialgia, artralgia e ou lombalgia), nos últimos 7 dias anteriores à visita. Indivíduos com infecções confirmadas laboratorialmente, independente da carga parasitária, que não relataram ou apresentavam sinais clínicos investigados nos últimos 7 dias precedentes à entrevista foram classificados como portadores assintomáticos da infecção. Todos os participantes do estudo que foram diagnosticados com malária vivax por meio da microscopia de gota espessa, sintomáticos ou não, durante todo o estudo foram tratados gratuitamente com CQ (dose total de 25 mg/kg durante três dias) e PQ (0,5 mg do comprimido/kg/dia por um período de 7 dias) conforme preconizado pelo Guia Prático de Tratamento de Malária (MS, 2012). Infecções com diagnóstico negativo por microscopia que foram detectados parasitos posteriormente por qPCR não receberam tratamento durante o estudo.

5.4.2 Classificação dos casos confirmados

Casos índices confirmados de malária foram classificados como autóctones, recaídas, importados ou introduzidos com base nos seguintes critérios (Pampana, 1963):

- a) Casos importados foram aqueles contraídos fora do município de Acrelândia, a área de estudo. A genotipagem parasitária poderá ainda sugerir que um caso é importado quando genótipos do parasito são claramente não relacionados com os circulantes na mesma localidade;
- b) Casos introduzidos foram os casos adquiridos localmente, mas diretamente derivados de um caso importado. A análise genotípica do parasito poderá confirmar a identidade genética entre o caso primário (importado) e o secundário (introduzido) sempre que as amostras de DNA correspondentes estivessem disponíveis;

- c) Recaídas de infecções prévias são definidas quando há histórico de malária vivax recente (informação obtida por durante a entrevista com o caso índice ou consulta o registro computadorizado de casos da malária) sem que haja outros casos diagnosticados na vizinhança (Pampana, 1963). Quando disponíveis, a tipagem molecular das amostras correspondentes nos auxiliou sobre a identidade genética entre parasitos da infecção primária e da possível recaída;
- d) Casos autóctones são aqueles que não podem ser classificados, com certeza, em qualquer uma das três categorias anteriores. Observe que esta classificação distingue explicitamente casos autóctones de casos introduzidos, ainda que ambos sejam transmitidos localmente.

Em todas as classificações utilizamos como parâmetros de avaliação a informação do indivíduo coletada por meio de questionário em nosso estudo (como período fora da área, tempo do início de sintomas e informações contidas no SIVEP-Malária no Centro de Vigilância de Endemias do município (**Figura 55**)). A genotipagem parasitária permitiu classificar os casos confirmados por lâmina de gota espessa e ou qPCR em recrudescência, recaídas homólogas ou infecções não tratadas persistentes (genótipo multilocus idêntico reaparecendo em repetidas infecções no mesmo indivíduo), infecções relacionadas em diferentes indivíduos (genótipos idênticos ou similares aparecendo em indivíduos distintos no mesmo ou em seguimentos consecutivos da RCD, sugerindo transmissão local (dentro do aglomerado) ou infecções não relacionadas, infecções esporádicas ou recaídas de clones heterólogos (diferentes genótipos) (**Figura 56**)).

Figura 55 - Classificação dos casos de malária pela origem da infecção, Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Figura 56 - Padrões de transmissão dos genótipos de *P. vivax* dentro dos aglomerados identificados. Círculos representam os indivíduos participantes do estudo albergando genótipos idênticos do parasito; vermelho e laranja representando moradores do domicílio índice e vizinho, respectivamente. As infecções B1 e C, ambas diagnosticadas na visita inicial (dia 0) tem uma fonte em comum (A) que pode não ter sido recrutado no estudo. D é uma infecção secundária com uma fonte conhecida no *cluster* (chamado de B1). B2 e B3 foram diagnosticados no mesmo participante como B1, 30 e 180 dias após a visita inicial. Se B1 foi tratado com CQ-PQ (como todos os casos de microscopia positiva identificadas no estudo), B2 pode ser uma recrudescência (provavelmente por falha da CQ) ou uma recaída (especialmente por falha da PQ); se B1 não foi identificado por microscopia e posteriormente não tratado durante o estudo, B2 pode representar uma infecção crônica sanguínea não tratada. B3 pode representar uma infecção crônica não tratada (se B1 e B2 não foram tratados) ou uma recaída tardia (se a CQ obteve sucesso em extinguir as formas sanguíneas do parasito, porém houve uma falha terapêutica da PQ na destruição de hipnozoítos).

5.5 GENOTIPAGEM PARASITÁRIA

Amostras de sangue capilar coletadas em cartão de FTA e amostras de sangue venoso de indivíduos com diagnóstico positivo por lâmina de gota espessa e ou por qPCR foram utilizadas para a tipagem molecular.

Com o objetivo de melhorar e aumentar a quantidade de DNA do parasito extraído das amostras positivas coletas por punção digital no estudo visando a tipagem das regiões de microssatélites, inicialmente realizamos uma amplificação do todo DNA genômico (WGA – whole-genome-amplification, em inglês) por meio do *kit* Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification kit (GE Healthcare, Rydalmere, New South Wales, Australia), segundo as recomendações do fabricante. Certamente, o referido procedimento assegurou uma uniformidade das amostras em termos de quantidade do material para análise e qualidade da fita de DNA gerada pela enzima, com alta fidelidade à original da amostra (Orjuela-Sánchez, 2010).

5.5.1 Marcadores polimórficos

Para a caracterização de *P. vivax*, utilizamos a tipagem de três marcadores moleculares altamente polimórficos, sendo um o fragmento três da região codificadora da proteína de superfície de merozoíto – *msp1F3* e dois microssatélites, *MS16* e *Pv3.27* (**Tabela 4**). Utilizamos para a amplificação dos fragmentos o protocolo de *nested* PCR descrito por Koepfli e colaboradores (Koepfli et al., 2009, 2011). Observamos que as infecções por *P. falciparum* foram inexistentes na população de estudo. A análise dos produtos de amplificação por qPCR, marcados com os corantes fluorescentes 6-FAM, VIC ou NED, foram realizadas em um sequenciador de DNA automatizado ABI3500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA), instalado no Departamento de Parasitologia do ICB/USP, para definir o tamanho (em pares de bases) e a abundância relativa (em unidades arbitrárias de fluorescência) de cada alelo.

Para a análise do tamanho dos fragmentos de DNA microssatélite em termos de número de pares de bases (pb) e de altura dos picos (que corresponde aproximadamente à abundância relativa de parasitos na amostra) fez-se uso do programa GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems). O GenScan ABI GS500 ROX (Applied Biosystems) foi utilizado como base para as medições de tamanhos dos fragmentos. Em relação à altura dos picos, nos consideramos na análise que os picos

individuais deveriam estar em uma altura mínima de fluorescência de 200 e nos isolados com amplificação de dois ou mais alelos distintos em um mesmo *locus* foi considerada como indicativa de uma infecção geneticamente mista (ou multiclonal), pois todos os marcadores selecionados estão presentes em uma única cópia no genoma haplóide dos estágios sanguíneos do parasito. Nestes casos se o pico obtido no segundo alelo teve altura, verificada por meio do programa GeneMapper, correspondente a pelo menos um terço da altura do pico majoritário atribuímos um ou mais haplótipos, correspondentes aos alelos encontrados em cada um dos três marcadores (Anderson et al., 2000). Os haplótipos que caracterizam um isolado individual foram definidos com combinações únicas de alelos em cada *locus*, considerando-se somente os alelos mais abundantes em casos de infecções geneticamente mistas. Para a identificação de haplótipos distintos na população de *P. vivax*, foram consideradas apenas amostras que foram tipadas nos três marcadores utilizados; comparamos a proporção de alelos compartilhados entre eles e assim atribuímos o mesmo haplótipo àquele cujo compartilhamento foi completo com todos os marcadores.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação de três marcadores genéticos específicos para *Plasmodium vivax*.

Marcador	Cromossomo	Oligonucleotídeos aninhados
MS16	9	FP: TTCCTGATGACAATTCGACGG RP: TCTCTTCCCATTGAGCATCGC FN: NED CTTGTTGTGGTTGTTGATGGTG RN: AGTACGTCAACCATGTGGGTAG
<i>msp1F3</i>	7	FP: GGAGAACATAAGCTACCTGTCC RP: GTTGTTACTTGGTCTTCCTCCC FN: VIC CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA RN: ATTACTTTGTCGTAGTCCTCGGCGTAGTCC
<i>Pv3.27</i>	3	FP: TTTTCAACTTGCTGCCCCCTG RP: CGTCATCGTCATTGCTCTGGAG FN: 6-FAM GGACATTCCAAATGTATGTGCAGTCG RN: CGTCATCGTCATTGCTCTGGAG

5.7 ANÁLISES DOS DADOS

Um banco de dados foi gerado no programa EpiInfo 3.5.2 (*Center for Diseases Control and Prevention*, Atlanta, GA, USA). Posteriormente esses dados foram transferidos para o programa STATA 14.1 (Stata, College Station, TX) para a análise exploratória dos dados.

Primariamente foi realizada uma análise descritiva de todas as informações contidas no estudo. Proporções foram comparadas por meio do teste qui-quadrado (teste χ^2) ou teste exato de Fisher. Significância estatística foi definida ao nível de 5% (testes bicaudais) e os intervalos de confiança de 95% (IC95%) para as estimativas. A média geométrica foi calculada para a carga parasitária (parasitos/ μ l de sangue) circulante em relação ao tipo de domicílio e também para a presença/ausência de sintomas clínicos. A densidade parasitária para *P. vivax* foi transformada em log, quando necessário.

Acerca de nosso desfecho (diagnóstico positivo para *P. vivax*, por microscopia e qPCR), realizamos análises em modelos distintos de regressão logística afim de verificarmos a associação entre variáveis de nível individual e variáveis domiciliares com a infecção por *P. vivax* diagnosticado durante os quatro seguimentos da RCD.

Com base em um modelo conceitual teórico (**Figura 57**), foram realizadas análises dos fatores independentes a fim de verificarmos possíveis associações entre as variáveis de nível individual e variáveis domiciliares com a infecção por *P. vivax* diagnosticada por microscopia de gota espessa (n = 5866 observações completas) e qPCR (n = 5807 observações completas) foi estruturada em distintos modelos de regressão logística multinível, para estimação dos *odds ratios* (OR) dos fatores preditores, com seus intervalos de confiança exatos de 95% (IC95%) a partir da distribuição binomial, em um ou mais seguimentos, independentemente de ter ou não sintomatologia clínica. Casos índices foram excluídos dessas análises. A opção pela utilização da análise multinível em nosso estudo se justifica pelo fato da estrutura aninhada dos nossos dados, portanto introduzindo uma dependência entre as observações que pode afetar as estimativas dos parâmetros no modelo. Teoricamente, a malária é uma doença que pode ser influenciada tanto por fatores biológicos inerentes a cada indivíduo, como por fatores ambientais que os mesmos compartilham na localidade estudada. A utilização da técnica permite a separação na modelagem, algo crucial para a compreensão da malária, já que esse tipo de análise

respeita a estrutura agrupada da população; portanto os modelos multiníveis são uma ferramenta analítica poderosa que permite a investigação simultânea de fatores em nível populacional e em nível individual que, por sua vez, contribuem para o desenvolvimento de doenças (Diez-Roux, Aiello, 2005). Assim, fizemos uso do comando “melogit” no software Stata (versão 14.1) para analisarmos os efeitos mistos por meio da regressão logística que incluem níveis de agregação como os fatores aleatórios. Para a análise dos painéis utilizamos modelos de regressão ordenados em níveis: o primeiro nível corresponde às observações individuais, o segundo nível inclui variáveis referentes ao domicílio, que são compartilhadas por todos os seus habitantes, e o terceiro nível se refere a cada grupo investigado em relação aos respectivos casos índices e o tempo de entrada no estudo. Para a análise total dos dados coletados no estudo, repetimos as observações (dia 0, 30, 60 e 180 dias) e, inserimos no modelo um nível relacionado ao momento da coleta de informações e material biológico no indivíduo (“visita”). Assim, para a composição do modelo utilizamos o número de observações totais obtidas em todos os seguimentos, ou seja, que a cada vez que o sujeito participou do estudo este constituiu uma observação. Como foram realizados quatro painéis de RCD, cada indivíduo pode contribuir com até quatro observações. A comparação primária refere-se à prevalência da infecção sintomática ou assintomática por *P. vivax* no interior do foco potencial de transmissão em torno do domicílio índice (compreendendo os habitantes do domicílio índice, exceto o caso índice, e de cinco domicílios vizinhos, < 3 km de distância) com aquela observada na mesma localidade, porém fora do foco potencial de transmissão (entre habitantes dos cinco domicílios controles, > 5 km) ajustada.

Em adição, nós testamos os modelos de efeitos mistos por regressão de Poisson para os dados, porém as variâncias dos efeitos aleatórios associadas com as estimativas foram substancialmente altas quando comparadas com as obtidas pelo modelo de regressão logística. Como consequência, nesse estudo nós apresentamos somente os resultados derivados das análises de regressão logística.

Figura 57 - Modelo conceitual de variáveis exploradas em nosso estudo, 2013, Município de Acrelândia, Acre.

As variáveis preditoras analisadas foram classificadas em:

- a) variáveis ambientais: distância do domicílio para o caso índice – índice, vizinho (< 3 km) e controle (> 5 km); número de moradores no domicílio (categórica; < 3 indivíduos, 3 a 5 moradores e, > 5 indivíduos);
- b) variáveis demográficas: idade (contínua; em anos), sexo (feminino e masculino), mês de entrada no estudo (de janeiro a julho de 2013), tempo de ocupação na localidade (contínua; em anos);
- c) variáveis comportamentais e de proteção: usos de mosquiteiros ou outras medidas protetivas contra o mosquito vetor, atividades de caça e/ou pesca, atividades na mata após às 18 h e dormir próximo ao rio;
- d) Morbidade: presença de sintomas (febre, cefaleia, artralgia, mialgia e ou lombalgia) nos últimos sete dias anteriores a visita e; infecção pregressa por malária vivax nos últimos seis meses.

O software livre QGIS® 2.16.2 (QGIS, 2015) foi utilizado para a confecção dos mapas apresentados por meio de suas respectivas coordenadas geográficas (latitude e longitude).

5.7 ASPECTOS ÉTICOS

Os participantes da pesquisa estavam sujeitos à riscos mínimos decorrentes da punção venosa e punção capilar de sangue (dor, com mínima possibilidade de sangramento local). Com o intuito de reduzir ao mínimo possível o risco de infecção local pela retirada de sangue venoso ou capilar, empregou-se o uso de material descartável para a coleta de sangue, associado à assepsia local.

O protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pela comissão de Ética em Experimentação com Seres Humanos do ICB/USP (parecer 1105/CEP, 25/03/2013).

6 RESULTADOS

Os resultados referentes aos quatro seguimentos de RCD são apresentados a seguir.

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Características demográficas e ambientais dos 1923 participantes do estudo (aproximadamente 14% da população de Acrelândia) são apresentadas de acordo com a classificação do domicílio (**Tabelas 5 a 9**). Foram elegíveis para os 41 domicílios índices, 204 indivíduos > 3 meses de idade (incluindo os 41 casos índices). Para os 205 domicílios vizinhos (a uma distância < 3 km do domicílio índice) foram recrutadas 878 pessoas e, 841 participantes residiam em domicílios a mais de 5 km de distância do domicílio índice. Em geral, a idade média dos participantes do estudo foi de 26,5 anos (3 meses a 89 anos de idade) e 53,9% (1037) indivíduos recrutados são do sexo masculino. Predominou (83,9%) a participação no estudo de indivíduos nascidos na região da Amazônia Legal brasileira. O tempo médio de moradia dos participantes foi de 23,4 anos na região amazônica, 9 anos de ocupação nas localidades analisadas e o tempo médio de moradia na residência foi de 6,8 anos. Hábitos que podem estar associados à infecção pelo plasmódio foram analisados. Menos de 40% dos participantes tinham o hábito de caçar e ou pescar, 209 dormiam próximo ao rio/igarapé e 350 exerciam atividades regulares na mata após as 18 h.

Cerca de metade dos indivíduos entrevistados reportaram pelo menos um diagnóstico positivo de malária durante a vida, porém < 5% possuíam histórico de malária nos últimos seis meses que antecederam a visita. Entre os participantes que relataram terem tido diagnóstico pregresso positivo para malária (49,2%) houve uma média 7,6 infecções, com uma amplitude de 1 a mais de 100 infecções relatadas; infecções progressas por *P. vivax* ocorreu em 35,4% dos entrevistados e 252 participantes relataram terem tido malária falciparum em algum momento da vida.

Tabela 5 - Características demográficas e ambientais dos participantes do estudo (n=1923), Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Variáveis (% pelo total das colunas)	Domicílio Índice (DI) (n= 41)		Demais moradores do DI (n=163)		Domicílios vizinhos (< 3 km) (n=878)		Domicílios controles (> 5 km) (n=841)		Total (n=1923)	
	n*	%	n*	%	n*	%	n*	%	n*	%
Sexo										
Masculino	27	65,9	96	58,9	474	54,0	440	52	1037	53,9
Feminino	14	34,1	67	41,1	404	46,0	401	48	886	46,1
Idade (anos)										
≤ 7	7	17,1	34	20,9	160	18,2	123	14,6	324	16,8
8 - 15	3	7,3	41	25,1	199	22,7	192	22,8	435	22,6
16 - 30	12	29,3	43	26,4	183	20,8	177	21,1	415	21,6
≥ 31	19	46,3	45	27,6	336	38,3	349	41,5	749	39,0
Tempo de Amazônia (anos)										
		$\bar{X} = 26,4 (2-64)$		$\bar{X} = 20,9 (0,25-68)$		$\bar{X} = 23,5 (0,33-83)$		$\bar{X} = 23,6 (0,33-84)$		$\mu = 23,4 (0,25-84)$
Tempo de ocupação na localidade (anos)										
		$\bar{X} = 9,0 (0,02-64)$		$\bar{X} = 7,8 (0,02-61)$		$\bar{X} = 7,2 (0,08-56)$		$\bar{X} = 11,1 (0,08-64)$		$\mu = 9,0 (0,02-64)$
Tempo de ocupação na residência (anos)										
		$\bar{X} = 5,0 (0,08-18)$		$\bar{X} = 5,5 (0,02-53)$		$\bar{X} = 5,5 (0,08-52)$		$\bar{X} = 8,6 (0,08-50)$		$\mu = 6,8 (0,02-53)$
Local de nascimento										
Amazônia Legal	34	82,9	147	90,2	763	86,9	669	79,5	1613	83,9
Extra Amazônia	7	17,1	16	9,8	115	13,1	172	20,5	310	16,1
Atividades de caça e/ou pesca										
Não	21	51,2	101	62,0	573	65,3	493	58,6	1188	61,8
Sim	20	48,8	62	38,0	305	34,7	348	41,4	735	38,2
Dorme próximo ao rio										
Não	37	90,2	144	88,3	792	90,2	741	88,1	1714	89,1
Sim	4	9,8	19	11,7	86	9,8	100	11,9	209	10,9
Atividades na mata após as 18h										
Não	29	70,7	131	80,4	720	82,0	693	82,4	1573	81,8
Sim	12	29,3	32	19,6	158	18,0	148	17,6	350	18,2
Infecção por malária na vida										
Não	12	$\bar{X} = 4,9 (1-20)$	81	$\bar{X} = 7,4 (1-40)$	433	$\bar{X} = 8,5 (1-100^\#)$	428	$\bar{X} = 6,9 (1-100^\#)$	954	$\bar{X} = 7,6 (1-100^\#)$
Sim	29	70,7	81	49,7	437	49,8	399	47,4	946	49,2
Não sabe/não se lembra	0	0	1	0,6	8	0,9	14	1,7	23	1,2

*O total de observações difere em algumas variáveis devido ausência de informação.

Relatório mais de 100 casos de malária durante a vida.

Na visita inicial havia 1660 indivíduos residindo nos domicílios investigados no estudo. Entretanto, 119 pessoas estavam ausentes e 31 se recusaram a fornecer material biológico para diagnóstico de malária. Foram coletadas amostra biológica de 1.510 indivíduos - 93,1% de sangue capilar e 6,9% de sangue venoso (**Tabela 6**). No seguimento posterior (visita de 30 dias), 1.417 indivíduos (de um total de 1.730 participantes) forneceram material biológico para confecção da lâmina de gota espessa e cartão de FTA (**Tabela 7**). Na visita de 60 dias após a visita inicial, 34 participantes se recusaram a fornecer material biológico, 194 estavam ausentes no momento da visita e 37 haviam mudado para outro local; assim 1.467 indivíduos forneceram amostras de sangue capilar (1444) e sangue venoso (23) para o diagnóstico da malária (**Tabela 8**). Por fim, 180 dias após a visita inicial, 1.513 participantes realizaram exames diagnósticos para malária (**Tabela 9**).

Tabela 7 - Características demográficas e ambientais - visita 30 dias, 2013, Município de Acrelândia, Acre.

Variáveis (% pelo total das colunas)	Domicílio Índice [#] (n=161)			Domicílios vizinhos (<3 km) (n=803)			Domicílios controles (>5 km) (n=766)			Total (N=1730)
	n*	%		n*	%		n*	%		
Sexo	161			803			766			1730
Masculino	93	57,8		433	53,9		406	53,0		932
Feminino	68	42,2		370	46,1		360	47,0		798
Idade (anos)	$\bar{X} = 22,3$	$(0,42-7,1)$		$\bar{X} = 25,9$	$(0,33-89)$		$\bar{X} = 28,5$	$(0,67-89)$		$\mu = 26,7$
≤ 7	33	20,5		143	17,8		109	14,2		285
8 - 15	41	25,5		186	23,2		176	23		403
16 - 30	42	26,1		153	19		156	20,4		351
≥ 31	45	27,9		321	40		325	42,4		691
Migrantes Extra – Amazônia	16	9,9		112	14		155	20,2		283
Tempo de Amazônia (anos)	$\bar{X} = 20,9$	$(0,42-68)$		$\bar{X} = 23,2$	$(0,33-71)$		$\bar{X} = 24,0$	$(0,67-82)$		$\mu = 23,4$
Tempo de ocupação na localidade (anos)	$\bar{X} = 7,9$	$(0,08-61)$		$\bar{X} = 7,2$	$(0,08-56)$		$\bar{X} = 11,4$	$(0,08-64)$		$\mu = 9,0$
Tempo de moradia na casa (anos)	$\bar{X} = 5,6$	$(0,08-53)$		$\bar{X} = 5,3$	$(0,08-52)$		$\bar{X} = 7,6$	$(0,08-53)$		$\mu = 8,8$
Hábito de caça / pesca	60	37,3		287	35,7		321	41,9		668
Dorme próximo ao rio	17	10,6		78	9,7		85	11,1		180
Atividade na mata após as 18h	30	18,6		149	18,6		126	16,4		305
Infecção por P. vivax (últimos 6 meses)	27	16,7		23	2,9		15	1,9		65
Sintomas clínico**	143			647			627			1417
Assintomático	123	86,0		585	90,4		603	96,2		1311
Sintomático	20	14,0		62	9,6		24	3,8		106
Material biológico coletado**	143			647			627			1417
Sangue capilar	135	94,4		639	98,8		627	100		1401
Sangue venoso	8	5,6		8	1,2		0	0		16
Recusa	3	1,9		14	1,7		17	2,2		34
Ausentes	15	9,3		81	10,1		91	11,9		187
Mudaram	0	0		34	4,2		17	2,2		51
Diagnóstico por microscopia gota espessa	143			647			627			1417
Negativo	136	95,1		634	98,0		627	100		1397
Positivo	7	4,9		13	2,0		0	0		20
Diagnóstico molecular^a	143			645			626			1414
Negativo	125	87,4		600	93,0		591	94,4		1316
Positivo	18	12,6		45	7,0		35	5,6		98

[#]Casos índices (n=41) foram excluídos das análises

^{*}O total de observações difere em algumas variáveis devido ausência de informação.

^{**}Sintomas – febre, cefaleia, artralgia, mialgia e lombalgia – relatados nos últimos 7 dias que antecederam a visita.

^aPCR real time e ou Tipagem molecular

Tabela 8 - Características demográficas e ambientais da visita de 60 dias, 2013, Município de Acrelândia, Acre.

Variáveis (% pelo total das colunas)	Domicílio índice ^a (n=158)			Domicílios vizinhos (<3 km) (n=793)			Domicílios controles (>5 km) (n=781)			Total (N=1732)		
	n*	%		n*	%		n*	%		n*	%	
Sexo												
Masculino	90	57		422	53,2		406	52		918	53	
Feminino	68	43		371	46,8		375	48		814	47	
Idade (anos)												
≤ 7	33	20,9		140	17,7		112	14,4		285	16,5	
8 - 15	41	26		189	23,8		179	22,9		409	23,6	
16 - 30	41	26		147	18,5		157	20,1		345	19,9	
≥ 31	43	27,1		317	40		333	42,6		693	40	
Migrantes Extra – Amazônia	15	9,5		110	13,9		162	20,7		287	16,6	
Tempo de Amazônia (anos)												
	$\bar{X}$ = 21,4 (0,42-68)			$\bar{X}$ = 23,1 (0,33-75)			$\bar{X}$ = 23,9 (0,67-84)			$\bar{X}$ = 23,3 (0,33-84)		
Tempo de ocupação na localidade (anos)	$\bar{X}$ = 8,2 (0,02-61)			$\bar{X}$ = 7,3 (0,08-56)			$\bar{X}$ = 11,3 (0,08-64)			$\bar{X}$ = 9,1 (0,02-64)		
Tempo de moradia na casa (anos)	$\bar{X}$ = 5,6 (0,02-53)			$\bar{X}$ = 5,5 (0,08-52)			$\bar{X}$ = 8,7 (0,08-50)			$\bar{X}$ = 6,8 (0,02-53)		
Hábito de caça / pesca	58	36,7		279	35,2		322	41,2		659	38,1	
Dorme próximo ao rio	18	11,4		76	9,6		90	11,5		184	10,6	
Atividade na mata após as 18h	30	19		142	17,9		130	16,7		302	17,4	
Infecção por P. vivax (últimos 6 meses)	30	19		38	47,9		14	17,9		82	47,3	
Sintomas clínico**	141			677			649			1467		
Assintomático	125	88,7		598	88,3		621	95,7		1344	91,6	
Sintomático	16	11,3		79	11,7		28	4,3		123	8,4	
Material biológico coletado	141			677			649			1467		
Sangue capilar	133	94,3		662	97,8		649	100		1444	98,4	
Sangue venoso	8	5,7		15	2,2		0	0		23	1,6	
Recusa	4	2,5		10	1,3		20	2,6		34	2	
Ausentes	12	7,6		85	10,7		97	12,4		194	11,2	
Mudaram	3	1,9		15	1,9		19	2,4		37	2,1	
Diagnóstico por microscopia gota espessa	141			677			649			1467		
Negativo	131	92,9		647	95,6		649	100		1427	97,3	
Positivo	10	7,1		30	4,4		0	0		40	2,7	
Diagnóstico molecular^a	139			658			636			1433		
Negativo	128	92,1		623	94,7		634	99,7		1385	96,7	
Positivo	11	7,9		35	5,3		2	0,3		48	3,3	

*Casos índices (n=40) foram excluídos das análises.

^aO total de observações difere em algumas variáveis devido ausência de informação.

**Sintomas – febre, cefaleia, artralgia, mialgia e lombalgia - relatados nos últimos 7 dias que antecederam a visita.

^aPCR real time e ou Tipagem molecular

Tabela 9 - Características demográficas e ambientais da visita de 180 dias, 2013, Município de Acrelândia, Acre.

Variáveis (% pelo total das colunas)	Domicílio índice [#] (n=158)		Domicílios vizinhos (<3 km) (n=816)		Domicílios controles (>5 km) (n=802)		Total (N=1776)	
	n*	%	n*	%	n*	%	n*	%
Sexo								
Masculino	91	57,6	432	52,9	415	51,7	938	52,8
Feminino	67	42,4	384	47,1	387	48,3	838	47,2
Idade (anos)								
≤ 7	33	20,9	146	17,9	117	14,6	296	16,7
8 - 15	40	25,3	188	23	184	22,9	412	23,2
16 - 30	41	25,9	162	19,9	163	20,3	366	20,6
≥ 31	44	27,9	320	39,2	338	42,2	702	39,5
Migrantes Extra – Amazônia	15	9,5	110	13,5	170	21,2	295	16,6
Tempo de Amazônia (anos)								
Tempo de ocupação na localidade (anos)								
	33	20,9	146	17,9	117	14,6	296	16,7
Tempo de moradia na casa (anos)								
	40	25,3	188	23	184	22,9	412	23,2
Hábito de caça / pesca								
	59	37,3	282	34,6	327	40,8	668	37,6
Dorme próximo ao rio								
	18	11,4	79	9,7	96	12	193	10,9
Atividade na mata após as 18h								
	30	19	146	17,9	139	17,3	315	17,7
Infecção por P. vivax (últimos 6 meses)								
	27	17,1	35	4,3	2	0,2	64	3,6
Sintomas clínico**								
Assintomático	146		689		678		1513	
Sintomático	136	93,2	626	90,9	652	96,2	1414	93,5
Material biológico coletado**								
Sangue capilar	146		689		678		1513	
Sangue venoso	133	91,1	671	97,4	677	99,9	1481	97,9
Recusa	13	8,9	18	2,6	1	0,1	32	2,1
Ausentes								
	3	1,9	16	4,8	26	3,2	45	2,5
Mudaram								
	8	5,1	65	8	82	10,0	155	8,7
Diagnóstico por microscopia gota espessa								
Negativo	146		689		678		1513	
Positivo	140	95,9	667	96,8	676	99,7	1483	98,0
Diagnóstico molecular[#]								
Negativo	6	4,1	22	3,2	2	0,3	30	2,0
Positivo	146		686		676		1508	
	136	93,2	652	95,0	667	98,7	1455	96,5
	10	6,8	34	5,0	9	1,3	53	3,5

[#]Casos índices (n=40) foram excluídos das análises.

^{*}O total de observações difere em algumas variáveis devido ausência de informação.

^{**}Sintomas – febre, cefaleia, artralgia, mialgia e lombalgia – relatados nos últimos 7 dias que antecederam a visita.

³PCR real time e ou Tipagem molecular

Por meio de um questionário padronizado coletamos informações acerca da presença de sintomas clínicos nos últimos 7 dias anteriores à visita. Cefaleia e febre foram os sintomas mais comuns relatados entre os participantes (**Figura 58**). Em geral, das 5.866 amostras coletadas por meio da RCD, 480 (8,2%) relataram sintomas clínicos nos últimos 7 dias (cefaleia, febre, lombalgia, artralgia e ou mialgia) anteriores à visita de nossa equipe. Destes 399 (83,1%) participantes relataram cefaleia e 302 (63,0%) reportaram ou apresentavam febre no momento da visita. Não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de sintomatologia clínica com a idade dos indivíduos participantes do estudo (OR = 1,00; IC95%, 0,99-1,00; $P > 0,005$).

Figura 58 - Frequência de sintomas clínicos relatados nos últimos 7 dias anteriores aos seguimentos de RCD, Município de Acrelândia, Acre, 2013.

6.2 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA INFECÇÃO:

Durante todo o estudo houveram 144 recusas (2,4%) para coleta de sangue capilar em alguma visita ou em todo o seguimento. Entre os principais motivos de recusa destacam-se as justificativas dos indivíduos da ausência de sintomas, a ausência de casos de malária no domicílio e na localidade e o temor em retirar sangue (tanto pela punção capilar como pela venosa). No total foram coletadas 6.028 amostras de sangue venoso ou capilar para a confecção de lâminas de gota espessa – 1.510 (25,1%) na primeira visita, 1.458 (24,2%) na visita de 30 dias, 1.507 (25,0%) no seguimento de 60 dias e 1.553 (25,7%) 180 dias após a visita inicial. Em nosso estudo 99,0% das amostras de sangue analisadas por microscopia foram verificadas por meio de método molecular de diagnóstico. Algumas amostras coletadas em cartão de FTA não puderam ser analisadas por qPCR, provavelmente devido a quantidade insuficiente de sangue capilar coletado e ou por possível degradação do material biológico. Assim, durante o estudo foram analisadas por qPCR um total de 5.969 amostras, sendo 1493 (25,0%) na visita inicial, 1.455 (24,4%) no seguimento de 30 dias, na vista de 60 após a inicial foram analisadas 1.473 (24,7%) amostras e, na última visita foram examinadas 1.548 (25,9%) amostras de sangue (**Figura 59**).

Figura 59 - Diagrama de Venn relatando a proporção de infecções por *Plasmodium vivax* diagnosticadas por diferentes métodos de diagnósticos durante a RCD, Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Dos indivíduos com resultado positivo para lâmina de gota espessa, 27 dos 108 casos positivos relataram no momento da entrevista que não haviam tido nenhum episódio da doença durante a vida, visita inicial (6/18), 30 dias (6/20), 60 dias (9/40) e, visita de 180 dias após o recrutamento (6/30).

A média de idade para todos os 108 indivíduos com microscopia positiva foi de 24,9 anos e, de 24,9 anos para os 293 casos positivos por qPCR. A média de idade entre os casos positivos para gota espessa e diagnóstico molecular durante as quatro RCD é apresentada (**Figura 60**).

Figura 60 - Idade média em anos (amplitude) de indivíduos com diagnóstico positivo para gota espessa e método molecular, em diferentes seguimentos, Acrelândia, Acre, 2013.

6.2.1 Casos índices

Entre os meses de janeiro a julho houve o recrutamento de 41 indivíduos com malária confirmada laboratorialmente por microscopia de gota espessa (“casos índices”) residindo em diferentes localidades (listadas acima) no Município de Acrelândia, exceto no PEP. Este número correspondeu a 21,9% do total de infecções notificadas no município entre os meses de janeiro a julho do ano de 2013. Cerca de 24 (58,6%) casos foram classificados como casos autóctones, 11 (26,8%) como possíveis recaídas (baseados na presença de malária nos últimos seis meses) e, seis (14,6%) como casos importados (Pampana, 1963). Entre os 41 indivíduos índices, 27 são do sexo masculino (65,9%), 75,6% (31) eram indivíduos > 15 anos de idade, com idade média de 28,4 anos (2-64 anos) e o tempo de ocupação na localidade variou entre 10 meses a 43 anos (média de 7,9 anos). Relatos de atividades frequentes na mata foi de 30,0% dos casos índices e 70,7% (29) noticiaram que diagnosticados com malária em algum momento da vida. A **Tabela 10** apresenta a ocorrência de infecção por *P. vivax* entre os indivíduos classificados como índices durante os diferentes períodos de seguimento do estudo. Dos 41 casos índices examinados na visita inicial, somente 1 caso foi diagnosticado como negativo por qPCR. Provavelmente esse resultado se deu em consequência da ausência do indivíduo (previamente diagnosticado, por gota espessa, com malária vivax em sua residência no momento da visita pela equipe de endemias do município de Acrelândia, sendo a amostra de sangue venoso desse indivíduo coletada, por nossa equipe de campo, somente após o 3º dia de tratamento preconizado para a malária (CQ durante 3 dias e PQ por 7 dias). Entretanto, quando realizado a tipagem molecular dessa amostra identificou-se a presença de material genético do parasito.

Tabela 10 - Infecção por *P. vivax* diagnosticada por microscopia de lâmina de gota espessa e diagnóstico molecular nos casos índices durante os diferentes seguimentos de RCD, Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Variável (% pelo total das colunas)	Visita inicial ^a		Visita 30 dias ^a		Visita 60 dias ^a		Visita 180 dias ^a		Total ^a	
	n=41	%	n=41	%	n=40	%	n=40	%	n=162	%
<i>Infecção diagnosticada por gota espessa*</i>	41	100	5	12,2	8	20,0	4	10,0	58	35,8
Assintomática	0	0	2	40,0	2	30,0	1	25,0	5	8,6
Sintomática**	41	100	3	60,0	6	70,0	3	75,0	53	91,4
<i>Infecção diagnosticada por método molecular</i>	41	100	9	22,0	11	27,5	6	15,0	67	41,4
Assintomática	0	0	6	66,7	5	45,5	3	50,0	14	20,9
Sintomática**	41	100	3	33,3	6	54,5	3	50,0	53	79,1

*Todos participantes com diagnóstico positivo pelo exame de microscopia de gota espessa foram medicados de acordo com o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde.

**Sintomas – cefaleia, febre, artralgia, mialgia e lombalgia – relatado nos últimos 7 dias anteriores à visita.

^aNúmeros diferem devido à ausência de informação.

Durante as quatro RCD, em relação ao diagnóstico de gota espessa, dos 41 casos índices com diagnóstico confirmado no primeiro seguimento, 14 desses indivíduos apresentaram novamente diagnóstico positivo para *P. vivax* por microscopia de gota espessa no decorrer do estudo (12 casos com mais um episódio de malária vivax, um indivíduo apresentou três infecções e um participante foi diagnosticado como positivo para *P. vivax* nos quatro seguimentos do estudo). O método molecular identificou entre os 41 casos índices, 23 indivíduos com mais de um caso de malária vivax (21 com dois episódios, um participante com três infecções diagnosticadas e um caso com exame positivo nos quatro seguimentos).

6.2.2 Estratégia de Busca Ativa Reativa

Foram realizados dois métodos para se diagnosticar infecção por *P. vivax* entre os participantes do estudo.

6.2.2.1 Microscopia de gota espessa

Durante o período vigente do estudo, um total de 108 casos positivos identificados pela RCD foram diagnosticados em 5866 exames de lâminas de gota espessa (1,84%) em um total de 451 domicílios participantes. Não foi diagnosticado nenhum caso positivo para *P. falciparum* e *P. malariae* durante a RCD. Desse total, 58,7% das amostras (63) eram provenientes de indivíduos que relataram a presença de sintoma(s) decorrentes da infecção. Em diferentes painéis evidenciamos diferenças em relação à positividade para *P. vivax* entre os diferentes tipos de domicílios (**Figura 61**). Por meio da RCD, a microscopia identificou 18 infecções por *P. vivax* na visita inicial [12 no domicílio índice (excluindo os casos índices), 5 casos entre os vizinhos e, somente 1 caso entre os domicílios controles]. Na RCD de 30 dias, 20 casos de malária vivax foram detectados (7 no domicílio índice, 13 casos nos vizinhos e nenhuma lâmina positiva entre os moradores dos domicílios controles), Quarenta casos positivos foram verificados na visita de 60 dias (10 entre os domicílios índices, 30 casos entre os vizinhos e nenhum caso entre os controles) e, finalmente 30 casos diagnosticados na visita de 180 dias após o início do estudo, sendo 6 casos nos domicílios índices, 22 entre os vizinhos e dois casos por malária vivax entre os indivíduos controles. Estes resultados indicam uma maior probabilidade de se detectar infecções por *P. vivax* entre os domicílios índices quando comparados com indivíduos

selecionados aleatoriamente na mesma área (moradores de domicílios controles). Interessantemente, verificou-se um aumento no risco de infecção nos domicílios índices não somente na visita inicial, mas também nos demais seguimentos pela RCD.

Uma questão de debate ocorre em relação a logística da busca ativa reativa ser realizada somente para os domicílios índices ou deve-se estender o monitoramento para seus vizinhos. Nós verificamos por meio das taxas de microscopia positiva entre os domicílios vizinhos, valores de 0,7% (recrutamento) para 4,4% (60 dias). Na primeira RCD, infecções confirmadas por microscopia foram raras entre os moradores vizinhos, como verificado para os domicílios controles (Teste exato de Fisher, $P = 0,220$), sugerindo que a RCD nos domicílios vizinhos na visita inicial não é efetiva como um diagnóstico adicional para infecções patentes quando comparado aos indivíduos monitorados aleatoriamente residindo na mesma localidade. Em contrapartida, durante todos os outros seguimentos de RCD as prevalências foram similares entre os domicílios vizinhos e índices (Teste exato de Fisher, $P > 0,05$ em todas as comparações) e altamente significativa em relação aos domicílios controles (Teste exato de Fisher, $P < 0,001$ em todas as comparações) indicando que o monitoramento tanto de moradores de domicílios índices e domicílios vizinhos são ambos efetivos para se diagnosticar novas infecções (Figura). Em geral, 70 lâminas (2,6%) coletadas entre os moradores de domicílios vizinhos foram positivas em um total de 2703 exames realizados; 32 (45,7%) das lâminas positivas eram de indivíduos assintomáticos que provavelmente não seriam identificados pela vigilância de rotina para malária.

Em geral, 56 casos positivos foram identificados pela RCD em apenas um seguimento; 23 indivíduos tiveram resultado de microscopia positivo em mais de uma oportunidade (17 duas vezes, 6 em três seguimentos).

Figura 61 - Porcentagem de infecções por *Plasmodium vivax* diagnosticadas por microscopia de gota espessa, Município de Acrelândia, Acre, 2013.

6.2.2.2 Diagnóstico molecular

Em um universo de 5807 amostras de sangue analisadas por meio do diagnóstico molecular (qPCR), 293 amostras foram diagnosticadas positivas para *P. vivax* (5,0%). Nós verificamos significativa diferença na prevalência de *P. vivax* por qPCR entre os domicílios índices (exceto, casos índices), com taxas de 6,6% a 15%, 5,2% a 7,0% no domicílios vizinhos e prevalência de 0,3% a 5,5% nas residências controles.

Na visita inicial, foram identificados 94 casos positivos (22 entre os moradores dos domicílios índices, 37 e 25 casos entre os domicílios vizinhos e controles, respectivamente) e, 30 dias após a visita inicial, qPCR identificou 98 amostras positivas (18 entre os domicílios índices, 45 casos entre os vizinhos e 35 infecções para os domicílios controles). No seguimento subsequente (60 dias) 48 exames positivos foram identificados, sendo que 11 eram provenientes de moradores dos domicílios índices, 35 entre os vizinhos e somente dois casos confirmados para os residentes nos domicílios controles. No seguimento de 180 dias, 53 casos de malária vivax foram identificados por meio da estratégia de RCD, onde 10 foram identificados entre os domicílios índices, 34 infecções entre as residências vizinhas e 9 casos para os domicílios controles (**Figura 62**). Nota-se que nos dois seguimentos iniciais (dia 0 e dia 30), a prevalência de *P. vivax* foi significativamente maior nos domicílios índices quando comparado com os domicílios vizinhos e domicílios controles (Teste exato de Fisher, $P < 0,001$ em ambas as comparações), porém não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados domicílios vizinhos e controles (Teste exato de Fisher, $P > 0,05$ em ambas as comparações). Portanto, o monitoramento por meio da RCD dos domicílios vizinhos na descoberta de novas infecções não se mostrou efetivo em relação ao monitoramento de indivíduos selecionados aleatoriamente na mesma área na visita inicial e na RCD de 30 dias. Posteriormente, foram identificadas proporções similares de *P. vivax* entre os moradores dos domicílios índices e vizinhos nas visitas de 60 dias (Teste exato de Fisher, $P = 0,231$) e de 180 dias (Teste exato de Fisher, $P = 0,427$). Nos dois seguimentos finais, a prevalência de malária vivax detectada por qPCR foi significativamente alta nos domicílios vizinhos quando comparadas as residências controles nos dois seguimentos finais (Teste exato de Fisher, $P < 0,001$ em ambas as comparações).

Figura 62 - Percentagem de infecções por *Plasmodium vivax* diagnosticadas por método molecular, segundo tipo de domicílios Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Infecções recorrentes diagnosticadas por qPCR foi constatada em 44 participantes durante todo o estudo; 33 indivíduos apresentaram diagnóstico molecular positivo em duas ocasiões e 11 em três momentos distintos.

*6.2.2.3 Proporção de infecções por *Plasmodium vivax* entre os diferentes métodos de diagnósticos*

De maneira não surpreendente, na análise total o qPCR identificou mais de duas vezes o número de infecções por *P. vivax* quando comparado ao diagnóstico convencional (**Figura 63**). A prevalência por qPCR foi de 10,6% nos moradores dos domicílios índices (1,7 vezes maior quando comparado a microscopia), 5,7% entre os domicílios vizinhos (2,2 vezes aumentada em relação a microscopia) e, 3,2% nos domicílios controles (> 30 vezes maior comparado a microscopia). A imensa maioria (87,6%) das infecções diagnosticadas por qPCR nos indivíduos controles foram assintomáticas, caracterizando uma circulação “silenciosa” de *P. vivax* na comunidade que provavelmente não seria monitorada pela RCD.

Um teste da diferença (teste de McNemar) entre os diferentes métodos de diagnósticos foi calculado. Em todos os quatro seguimentos verificou-se diferença estatisticamente significativa em relação a frequência do desfecho em comparação aos dois métodos utilizados para o diagnóstico de malária, assim como na análise total das amostras coletadas no estudo (**Tabelas 11 a 15**).

Figura 63 - Infecções por *Plasmodium vivax* diagnosticadas por diferentes métodos de diagnóstico, Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Tabela 11 - Teste da diferença e teste de concordância entre os diferentes métodos de diagnósticos* para *P. vivax*, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Molecular	Gota espessa		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	106	187	293
Negativo	2	5512	5514
Total	108	5699	5807

Teste qui-quadrado de McNemar = 181,1 ($P < 0,001$); Odds ratio = 93,5 {IC 95% (25,5-777,7)}

*Casos índices (n=41) foram excluídos das análises.

Tabela 12 - Teste da diferença e teste de concordância entre os diferentes métodos de diagnósticos para *P. vivax*, **visita inicial**, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Molecular	Gota espessa		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	16	78	94
Negativo	2	1356	1358
Total	18	1434	1452

Teste qui-quadrado de McNemar = 72,20 ($P < 0,001$); Odds ratio = 39 {IC 95% (10,4-327,7)}

*Casos índices (n=41) foram excluídos das análises.

Tabela 13 - Teste da diferença e teste de concordância entre os diferentes métodos de diagnósticos para *P. vivax*, **visita 30 dias**, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Molecular	Gota espessa		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	20	78	98
Negativo	0	1316	1316
Total	20	1394	1414

Teste qui-quadrado de McNemar = 78,0 ($P < 0,001$); Odds ratio = . {IC 95% (20,6-.)}

*Casos índices (n=41) foram excluídos das análises.

Tabela 14 - Teste da diferença e teste de concordância entre os diferentes métodos de diagnósticos* para *P. vivax*, **visita 60 dias**, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Molecular	Gota espessa		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	40	8	48
Negativo	0	1385	1385
Total	40	1393	1433

Teste qui-quadrado de McNemar = 8,0 ($P = 0,004$); Odds ratio = . {IC 95% (1,71-.)}

*Casos índices (n=40) foram excluídos das análises.

Tabela 15 - Teste da diferença e teste de concordância entre os diferentes métodos de diagnósticos* para *P. vivax*, **visita 180 dias**, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Molecular	Gota espessa		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	30	25	55
Negativo	0	1453	1453
Total	30	1478	1508

Teste qui-quadrado de McNemar = 25,0 ($P < 0,001$); Odds ratio = . {IC 95% (6,29-.)}

*Casos índices (n=40) foram excluídos das análises.

Durante os quatro seguimentos de RCD, o método molecular não identificou um total de 19 amostras positivas por microscopia para *P. vivax*. Isso pode ter ocorrido devido a degradação do sangue coletado em FTA, até o momento de sua análise, ou pela presença de inibidores da PCR. Entretanto, quando realizado a tipagem molecular para as amostras que foram gota espessa positivas porém, qPCR negativo para *P. vivax*, verificamos que apenas duas amostras não apresentavam material genético do parasito.

6.2.2.4 Tipo de domicílios, infecções assintomáticas e a carga parasitária

Do total de amostras positivas diagnósticas por método molecular (293), 63,8% (187/293) eram submicroscópicas (microscopia negativa). Cerca de 75,4% (221) da totalidade de casos positivos eram de indivíduos que relataram ausência de sintomas clínicos (assintomáticos), sendo submicroscópicas em 176 casos positivos (79,6%) (**Figura 64**).

Em geral, segundo a classificação do domicílio, verificou-se a proporção de infecções diagnosticadas por método molecular, entre estas a proporção de assintomáticos e subpatentes (**Figura 65**). Nos domicílios onde residia os casos índices (domicílio índice), das 61 amostras positivas em todos os seguimentos, 39 foram diagnosticadas em indivíduos assintomáticos e 45,9% (28/61) eram subpatentes. Dentre as infecções assintomáticas, 64,1% eram submicroscópicas (25/39). Entre os domicílios vizinhos 70,9% das infecções diagnosticadas (107/151) eram assintomáticas e 53,6% (81) subpatentes; dentre as assintomáticas 72% eram submicroscópicas (77/107). Nos domicílios controles (> 5 km) 75 das 81 infecções eram assintomáticas e 96,3% subpatentes e, quase que a totalidade das infecções sem sintomas (98,7%) eram submicroscópicas. Todas as infecções subpatentes não receberam tratamento antimalárico durante a vigência deste estudo.

Em geral, a microscopia diagnosticou 1,9 vezes e 1,2 vezes mais de infecções sintomáticas do que portadores assintomáticos nos domicílios índices e domicílios vizinhos, respectivamente, sugerindo que muitas desses diagnósticos adicionais por microscopia de gota espessa podem ser eventualmente detectados pelo sistema de rotina de vigilância baseado no monitoramento de casos febris. De forma oposta, qPCR identificou 1,8 vezes e 2,4 vezes mais portadores assintomáticos de *P. vivax* em relação as infecções sintomáticas nos domicílios índices e vizinhos, respectivamente. Além disso, entre os domicílios controles, método molecular revelou uma proporção de infecções assintomáticas 12,5 vezes maior em relação aos indivíduos sintomáticos.

Figura 64 - Diagrama de Venn relatando a proporção de infecções por *P. vivax* diagnosticadas por qPCR, ausência de sintomas e infecções subpatentes, durante as quatro RCD. Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Figura 65 - Proporção de infecções por *P. vivax* diagnosticadas por qPCR, ausência de sintomas e infecções subpatentes, segundo tipo de domicílios, Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Em relação aos diferentes painéis, na RCD inicial 12 das 18 infecções detectadas por microscopia convencional eram sintomáticas e, somente 14 (14,9%) dos 94 casos para malária vivax diagnosticados por qPCR apresentavam ou relataram sintomas clínicos para malária (**Tabela 16**). Cerca de 83% do total de infecções diagnosticadas pelo método molecular foram subpatentes. Dentre as infecções assintomáticas 92,5% não foram diagnosticadas pela microscopia de gota espessa (**Tabela 17**). Na visita de 30 dias, 15 indivíduos com diagnóstico convencional positivo (75%) apresentavam sintomas clínicos para malária. Indivíduos assintomáticos representaram 80,6% (79 casos) do total de diagnosticados positivamente por qPCR; desses casos, 74 infecções foram classificadas como subpatentes. No seguimento de 60 dias, infecções assintomáticas representaram 52,5% das infecções por microscopia de gota espessa e 58,3% da malária vivax detectada pelo método molecular. Verificou-se nesse seguimento somente 8 infecções subpatentes. No último inquérito, 17 dos 30 indivíduos com lâmina positiva para *P. vivax* possuíam

sintomas clínicos. Já para os casos detectados por método molecular, 36,4% do total de casos (35/55) relataram sinais clínicos característicos à infecção. As infecções subpatentes foram responsáveis por 43,4% dos casos detectados por qPCR; dentre os portadores assintomáticos da infecção, 61,8% eram subpatentes.

Tabela 16 - Frequência relativa e absoluta de infecções sintomáticas e assintomáticas de *Plasmodium vivax* diagnosticada por microscopia convencional em relação aos moradores dos diferentes tipos de domicílios participantes nos quatro seguimentos de Busca Ativa Reativa (RCD), 2013, Município de Acrelândia, Acre.

Seguimento de RCD	Tipo de infecção	Domicílios Índices*		Domicílios Vizinhos		Domicílios Controles		Valor de P ^a
		No. infecção	%	No. infecção	%	No. infecção	%	
1 (Dia 0)	Assintomática	5	3,4	0	0	1	0,2	< 0,001
	Sintomática**	7	4,8	5	0,7	0	0	< 0,001
	Total ^b	12	8,2	5	0,7	1	0,2	< 0,001
	n. testadas	147		688		634		
2 (Dia 30)	Assintomática	0	0	5	0,8	0	0	0,05
	Sintomática**	7	4,9	8	1,2	0	0	< 0,001
	Total ^c	7	4,9	13	2,0	0	0	< 0,001
	n. testadas	143		647		627		
3 (Dia 60)	Assintomática	4	2,8	15	2,2	0	0	< 0,001
	Sintomática**	6	4,3	15	2,2	0	0	< 0,001
	Total ^c	10	7,1	30	4,4	0	0	< 0,001
	n. testadas	141		679		647		
4 (Dia 180)	Assintomática	3	2,0	10	1,4	0	0	0,002
	Sintomática**	3	2,0	12	1,7	2	0,3	0,038
	Total ^c	6	4,1	22	3,2	2	0,3	< 0,001
	n. testadas	146		689		678		

*Casos índices (n=41) foram excluídos das análises.

**Relato de sintomas 7 dias anteriores à visita: febre, cefaleia, artralgia, mialgia e/ou lombalgia.

^aTeste bicaudal qui-quadrado em uma tabela de contingência para testar a hipótese nula de similaridade das proporções de amostras positivas (linhas).

^bComparações pareadas da taxa de positividade (linhas) por meio do teste exato de Fisher (nível de significância de 5%): domicílios índices > vizinhos e controles; domicílios vizinhos = domicílios controles.

^cComparações pareadas da proporção de positivos (linhas) por meio do teste exato de Fisher (nível de significância de 5%): domicílios índices e vizinhos > domicílios controles; domicílios índices = domicílios vizinhos.

Tabela 17 - Frequência relativa e absoluta de infecções sintomáticas e assintomáticas de *Plasmodium vivax* diagnosticada por método molecular em relação aos moradores dos diferentes tipos de domicílios participantes nos quatro seguimentos de Busca Ativa Reativa (RCD), 2013, Município de Acrelândia, Acre.

Seguimentos de RCD	Tipo de infecção	Domicílios índices*		Domicílios vizinhos		Domicílios controles		Valor de P ^a
		No. infecções	%	No. infecções	%	No. infecções	%	
1 (Dia 0)	Assintomática	16	10,9	31	4,6	33	5,2	0,009
	Sintomática**	6	4,1	6	0,9	2	0,3	0,001
	Total ^b	22	15,0	37	5,5	35	5,5	< 0,001
	<i>n. testadas</i>	147		674		631		
2 (Dia 30)	Assintomática	10	7,0	36	5,6	33	5,3	0,721
	Sintomática**	8	5,6	9	1,4	2	0,3	< 0,001
	Total ^b	18	12,6	45	7,0	35	5,6	0,012
	<i>n. testadas</i>	143		645		526		
3 (Dia 60)	Assintomática	7	5,0	19	2,9	2	0,3	< 0,001
	Sintomática**	4	2,9	16	2,4	0	0	< 0,001
	Total ^c	11	7,9	35	5,3	2	0,3	< 0,001
	<i>n. testadas</i>	139		660		634		
4 (Dia 180)	Assintomática	6	4,1	21	3,1	7	1,0	0,012
	Sintomática**	4	2,7	13	1,9	2	0,3	0,007
	Total ^c	10	6,8	34	5,0	9	1,3	< 0,001
	<i>n. testadas</i>	146		686		676		

*Casos índices (n=41) foram excluídos das análises.

**Relato de sintomas 7 dias anteriores à visita: febre, cefaleia, artralgia, mialgia e/ou lombalgia.

^aTeste qui-quadrado bicaudal em uma tabela de contingência para testar a hipótese nula de similaridade das proporções de amostras positivas (linhas).

^bComparações pareadas da proporção de positivos (linhas) por meio do teste exato de Fisher (nível de significância de 5%): domicílios índices > domicílios vizinhos e controles; domicílios vizinhos = domicílios controles.

^cComparações pareadas da proporção de positivos (linhas) por meio do teste exato de Fisher (nível de significância de 5%): domicílios índices e vizinhos > domicílios controles; domicílios índices = domicílios vizinhos.

Em geral, 1923 indivíduos foram testados em quatro ocasiões (visita inicial, 30, 60 e 180 dias) totalizando 6028 observações. As parasitemias para *P. vivax* foram calculadas em parasitos/μl de sangue e, quando necessária transformadas em escala logarítmica de base 10 (log). Para o cálculo da carga parasitária assumimos que um total de três cópias para o gene marcado foi amplificado para *P. vivax* (Imwong et al., 2015).

Nós estimamos a contribuição relativa dos moradores dos domicílios índices e vizinhos (que seriam alvos da RCD) e de moradores dos domicílios controles (que não fariam parte da estratégia de busca ativa) (**Figura 66**). Para alcançar esse objetivo, foram utilizados dados de 276 amostras positivas por qPCR com suas cargas parasitária quantificadas. A carga parasitária na população total foi de 26684,03 parasitos/μl de sangue com média geométrica de 10 parasitos/μl de sangue (IC95% [8,1-12,4]). Indivíduos infectados residentes nos domicílios índices contribuíram com

29,5% em relação a carga parasitária total; moradores de domicílios vizinhos e controles albergavam 62,8% e 7,7% da biomassa parasitária total, respectivamente. A média geométrica parasitária foi, em geral, cerca de duas vezes menor entre os moradores dos domicílios controles (5,6 [95%IC, 4,3-7,5] parasitos/ μ l) comparada aos indivíduos residentes nos domicílios índices (14,9 [95%IC, 8,9-24,7] parasitos/ μ l) e domicílios vizinhos (11,8 [95%IC, 8,9-16,4] parasitos/ μ l). Embora de grande ocorrência no estudo, as infecções subpatentes contribuíram com apenas 19,3 % em relação a parasitemia circulante total (média geométrica de 5,5 [95%IC, 4,6-6,7] parasitos/ μ l). Por outro lado, 80,7% da biomassa circulante de *P. vivax* foi atribuída a portadores sintomáticos do parasito (média geométrica parasitária de 34,6 [95%IC, 22,2-54,0] parasitos/ μ l) (**Tabelas 18 e 19**).

Se a microscopia convencional fosse o método exclusivo utilizado no diagnóstico da e assim guiar o tratamento da malária, certamente uma grande proporção da biomassa parasitária circulante nos indivíduos residentes nos domicílios índices (92,4%) e nas casas vizinhas (79,2%), porém em menos da metade (49,7%) entre os indivíduos controles, seriam detectadas e potencialmente removidas por um tratamento antimalárico efetivo.

Participantes com ausência de sintomas clínicos representam 75,4% do total das amostras positivas por qPCR e contribuíram com cerca de 68,3% do total da biomassa parasitária circulante. Densidade parasitária nesses indivíduos apresentou uma frequência de distribuição unimodal (deslocada para a esquerda) (**Figura 67**); 65,6% desses portadores assintomáticos possuem carga de *P. vivax* abaixo de 10 parasitos/ μ l de sangue, com uma média geométrica de 8,6 (95%IC, 6,8-10,8) parasitos/ μ l. Em contrapartida, indivíduos sintomáticos possuíam uma ampla frequência na distribuição da carga parasitária (média geométrica de 17,4 [95%IC, 10,6-28,4] parasitos/ μ l). Portadores de sintomas contribuíram com 26,1% do total de qPCR positivo e com 31,7% da biomassa parasitária circulante quantificada no estudo. Apesar da imensa maioria dos casos positivos entre os moradores de domicílios controles identificados por qPCR serem portadores assintomáticos de *P. vivax* (que não fariam parte da estratégia de RCD), estes indivíduos contribuíram com apenas 4,1% da carga parasitária da biomassa total de *P. vivax* circulante na população do estudo.

Tabela 18 - Média geométrica (Intervalo de confiança – IC 95%) e carga parasitária total (parasitos/ μ l**) de *Plasmodium vivax* segundo a classificação dos domicílios, seguimentos e sintomas pregressos, 2013. Município de Acrelândia, Acre, 2013.

	Dom Índice*		Dom Vizinhos (<3 km)		Dom Controles (>5 km)		Geral	
	Média (IC 95%)		Média (IC 95%)		Média (IC 95%)		Média (IC 95%)	
	Parasitos / μ l	Parasitos / μ l	Parasitos / μ l	Parasitos / μ l	Parasitos / μ l	Parasitos / μ l	Parasitos / μ l	Parasitos / μ l
Seguimentos								
Inicial	8,93 (4,01-19,90)	1388,61	3,70 (2,38-5,75)	913,47	3,65 (2,73-4,89)	227,95	4,55 (3,45-5,99)	2530,03
Assintomáticos	10,59 (3,94-28,48)	1189,12	2,61 (2,16-3,16)	96,42	3,52 (2,60-4,78)	214,60	3,91 (3,03-5,05)	1500,14
Sintomáticos#	5,67 (0,91-35,27)	199,49	54,89 (1,54-1959,2)	817,05	1,33 (0,44-4,04)	13,35	6,65 (2,19-20,21)	1029,89
30 dias	15,05 (5,73-39,53)	3642,11	11,56 (7,00-19,09)	2236,63	6,58 (4,57-9,47)	506,76	9,86 (7,23-13,44)	6385,50
Assintomáticos	5,09 (2,59-9,98)	78,80	13,82 (7,91-24,13)	2202,36	6,53 (4,43-9,62)	491,85	8,85 (6,47-12,11)	2773,01
Sintomáticos#	58,4 (10,45-326,3)	3563,31	4,08 (1,62-10,27)	34,27	7,43 (2,75-20,1)	14,91	16,63 (5,77-48,0)	3612,49
60 dias	33,05 (7,77-140,60)	1535,85	21,26 (9,16-49,36)	5769,74	10,18 (1,08e ^{-0,7} – 9,57e ^{0,8})	45,58	22,9 (11,71-44,7)	7351,17
Assintomáticos	40,92 (5,88-284,50)	1308,92	35,47 (8,96-140,5)	5452,22	10,18 (1,08 e ^{-0,7} – 9,57e ^{0,8})	45,58	33,41 (12,61-88,54)	6806,72
Sintomáticos#	20,07 (0,09-4427,12)	226,93	10,75 (4,82-23,96)	317,52	0	0	12,18 (5,57-26,6)	544,45
180 dias	20,17 (4,02-101,17)	1291,64	26,35 (11,85-58,58)	7845,48	15,05 (2,34-96,9)	1280,21	22,58 (12,08-42,21)	10417,33
Assintomáticos	10,32 (1,38-77,17)	439,11	32,25 (10,80-96,30)	6359,60	7,08 (1,07-46,65)	341,74	19,0 (8,56-42,18)	7140,45
Sintomáticos#	55,11 (0,85-3572,1)	852,53	18,25 (5,08-65,52)	1485,88	210,45 (2,37 e ⁻⁰⁸ – 1,87 e ¹⁰)	938,47	31,56 (10,55-94,44)	3276,88
Total	14,88 (8,95-24,73)	7858,20	11,80 (8,48-16,40)	16765,32	5,65 (4,26-7,50)	2060,51	10,0 (8,07-13,39)	26684,03
Assintomáticos	11,13 (6,22-19,94)	3015,94	11,40 (7,67-16,96)	14110,60	5,08 (3,89-6,62)	1093,78	8,57 (6,77-10,85)	18220,32
Sintomáticos#	25,46 (9,37-69,20)	4842,26	13,10 (7,21-23,81)	2654,72	21,83 (2,73-174,29)	966,73	17,40 (10,65-28,42)	8463,71

*Casos índices foram excluídos das análises.

**Sangue capilar[†] ou venoso.

#Relatos de sintomas (febre, cefaleia, mialgia, artralgia e ou lombalgia) 7 dias anteriores à visita domiciliar.

Tabela 19 - Média geométrica (Intervalo de confiança – IC 95%) e carga parasitária da infecção por *Plasmodium vivax*, segundo tipo de domicílios, característica da infecção e sintomas clínicos pregresso, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

	Dom índice* (n=63)		Dom vizinho (<3 km) (n=151)		Dom controle (>5 km) (n=81)		Geral (n=295)	
	Média (IC 95%)	Parasitos /μl	Média (IC 95%)	Parasitos /μl	Média (IC 95%)	Parasitos /μl	Média (IC 95%)	Parasitos /μl
Patentes** (n=108)	35,87 (16,81-76,54)	7264,02	31,46 (17,50-56,56)	13281,34	131,41 (2,15-8026,09)	989,70	34,61 (22,17-54,0)	21535,06 (80,7%)
Assintomático (n=47)	40,18 (12,66-127,52)	2451,34	74,30 (28,51-193,61)	10669,11	51,23 (.)	51,23	59,36 (29,60-119,04)	13171,68
Sintomático* (n=61)	32,84 (10,82-99,63)	4812,68	15,0 (7,85-28,66)	2612,23	210,45 (2,37e ⁻⁰⁶ – 1,87e ⁺⁰)	938,47	22,28 (12,63-39,29)	8363,38
Subpatentes (n=187)	5,44 (3,43-8,63)	594,18	6,13 (4,43-8,48)	3483,98	5,01 (3,90-6,43)	1070,81	5,54 (4,60-6,66)	5148,97 (19,3%)
Assintomático (n=176)	5,43 (3,31-8,91)	564,60	6,20 (4,43-8,68)	3441,50	4,91 (3,78-6,40)	1042,55	5,52 (4,55-6,70)	5048,65
Sintomático* (n=11)	5,53 (0,19-159,54)	29,58	4,91 (0,59-40,63)	42,48	7,03 (5,85-8,45)	28,26	5,78 (3,03-11,03)	100,32
Total (n=295)	14,88 (8,95-24,73)	7858,20	11,80 (8,48-16,41)	16765,32	5,65 (4,26-7,50)	2060,51	2,00 (1,61-2,48)	26684,03

* Casos índices foram excluídos das análises.

Relatos de sintomas (febre, cefaleia, mialgia, artralgia e ou lombalgia) 7 dias anteriores à visita domiciliar.

Figura 66 - Frequência de parasitos por microlitro de sangue de indivíduos participantes do estudo, segundo tipo de domicílio, Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Figura 67 - Frequência de parasitos por microlitro de sangue de indivíduos participantes do estudo, de acordo com a presença ou ausência de sintomas clínicos, Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Figura 68 - Frequência de *P. vivax* por microlitro de sangue de indivíduos participantes do estudo, de acordo com a característica da infecção, Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Verificamos que a carga parasitária se distribui de maneira uniforme entre as diferentes faixas etárias dos indivíduos analisados (**Figura 69**).

Figura 69 - Frequência de parasitos por microlitro de sangue de indivíduos participantes do estudo, segundo a idade (anos), Município de Acrelândia, Acre, 2013.

6.3 FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR *P. VIVAX*

Nós utilizamos como ferramenta de análise estatística a regressão logística para efeitos mistos (do inglês, *mixed-effects logistic regression analysis*) para verificarmos possíveis associações entre a proximidade da residência com o caso índice e se tal associação era estatisticamente significativa após o ajuste por possíveis variáveis confundidoras ao nível individual e domiciliar. Para a estruturação do modelo multinível foram selecionadas as variáveis preditoras:

- a) *variável domiciliar*: tipo de domicílio (índice, vizinho e controle), número de moradores na residência;
- b) *variáveis demográficas*: idade, sexo, mês de entrada no estudo (de janeiro a julho de 2013);
- c) *variáveis comportamentais*: atividades de caça e/ou pesca, atividades na mata após às 18h e dormir próximo ao rio e;
- d) *morbidade*: infecção pregressa por malária vivax nos últimos seis meses e sintomas clínicos nos últimos 7 dias anteriores à visita domiciliar.

Nosso desfecho foi a infecção por *P. vivax* correspondente a cada seguimento, ou seja, foram feitas as análises multinível para cada momento de visita (inicial, 30, 60 e 180 dias após a primeira visita) de forma independente das demais, no estudo de painel, além do total de observações em todo estudo.

Em geral, para o diagnóstico convencional, o modelo ajustado por variáveis domiciliares e demográficas (modelo 2) revelou uma chance aumentada em 56,7 vezes e em 18,5 vezes para se detectar a presença do parasito em moradores do domicílio índice e vizinhos, respectivamente em comparação aos moradores dos domicílios controles. Cada ano adicional de residência na localidade foi associada com uma redução de 4% (95%IC, 1-8%) na probabilidade para microscopia positiva no modelo completo ajustado, independentemente do tipo de domicílio (**Tabela 20**). Apesar de estatisticamente significativa, a chance de se detectar *P. vivax* por meio do qPCR foi menor, sendo a probabilidade aumentada em 3,4 vezes nos domicílios índices e cerca de 1,61 vezes maior nos domicílios vizinhos, comparadas aos domicílios controles (**Tabela 21**). Interessantemente, há uma probabilidade aumentada em se diagnosticar malária tanto por microscopia (OR = 5,42; IC95%, 3,36-8,75; $P < 0,001$) quanto pelo método molecular (OR = 5,02; IC95%, 2,77-9,09; $P < 0,001$) em indivíduos com histórico de infecção por malária nos últimos seis meses,

tanto na análise do modelo ajustado, quanto na análise como covariável independente.

Para testarmos a hipótese de que a presença de sintomas clínicos pode constituir em uma importante ferramenta de monitoramento das infecções por *P. vivax* na área estudada, realizamos a análise multinível inserindo a variável “sintomas clínicos nos últimos 7 dias” (modelo 3) e, verificamos, como o esperado, que a presença de sinais clínicos estava positivamente associada a infecção por *P. vivax* tanto no diagnóstico convencional (OR = 17,63; IC95%, 10,19-30,49; $P < 0,001$) como para o diagnóstico molecular (OR = 4,42; IC95%, 2,98-6,54; $P < 0,001$), apesar de uma associação mais discreta. Esses dados sugerem que tanto o monitoramento de indivíduos com histórico malária pregressa como a vigilância sindrômica, independentemente da proximidade com o caso índice, podem funcionar como critérios norteadores na busca por infecções vigentes.

Tabela 20 - Análise multinível por regressão logística para infecção por *Plasmodium vivax* diagnosticado por microscopia de gota espessa, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Efeitos fixos	Modelo nulo ^a					Modelo 2 ^b					Modelo 3 ^d				
	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	Valor de p
Intercepto	5866	0,001	0,001-0,002	<0,001	5866	0,001	0,001-0,01	<0,001	5866	0,001	0,001-0,002	<0,001	5866	0,001	0,001-0,01
Tipo de domicílio	5866				5866				5866				5866		
Controles (>5 km)	2588	1			2588	1			2588	1			2588	1	
Vizinhos (<3 km)	2701	29,96	7,88-113,9	<0,001	2701	29,77	8,01-110,6	<0,001	2701	18,54	5,25-65,55	<0,001	2701	17,67	4,60-67,94
Índices*	577	140,3	30,79-639,7	<0,001	577	141,9	32,41-620,9	<0,001	577	56,75	13,94-231,1	<0,001	577	82,83	18,28-375,2
Sexo	5866				5866				5866				5866		
Feminino	2908	1			2908	1			2908	1			2908	1	
Masculino	2958	1,14	0,73-1,79	0,564	2958	1,10	0,69-1,77	0,687	2958	1,08	0,65-1,81	0,757	2958	1,08	0,65-1,81
Idade (meses)	5866	1,00	0,98-1,01	0,755	5866	1,00	0,99-1,02	0,644	5866	1,00	0,99-1,02	0,970	5866	1,00	0,98-1,02
N° moradores	5866				5866				5866				5866		
<3	1634	1			1634	1			1634	1			1634	1	
3-15	2112	0,31	0,13-0,74	0,008	2112	0,46	0,21-1,01	0,054	2112	0,36	0,15-0,89	0,026	2112	0,36	0,15-0,89
>5	2120	0,65	0,28-1,51	0,312	2120	0,81	0,37-1,75	0,586	2120	0,61	0,25-1,48	0,276	2120	0,61	0,25-1,48
Tempo de ocupação	5866				5866	0,96	0,92-0,99	0,030	5866	0,96	0,92-1,01	0,110	5866	0,96	0,92-1,01
Hábitos ^c	5866				5866				5866				5866		
Não	3666	1			3666	1			3666	1			3666	1	
Sim	2200	1,18	0,68-2,04	0,553	2200	1,18	0,68-2,04	0,553	2200	1,25	0,69-2,25	0,461	2200	1,25	0,69-2,25
Infecção progressa por <i>P. vivax</i> ^{de}	5866				5866				5866				5866		
Não	5602	1			5602	1			5602	1			5602	1	
Sim	264	5,02	2,77-9,09	<0,001	264	5,02	2,77-9,09	<0,001	264	5,02	2,77-9,09	<0,001	264	5,02	<0,001
Sintomas clínicos ^{de}	5866				5866				5866				5866		
Assintomático	5386	1			5386	1			5386	1			5386	1	
Sintomático	480	17,63	10,19-30,49	<0,001	480	17,63	10,19-30,49	<0,001	480	17,63	10,19-30,49	<0,001	480	17,63	<0,001
Variação do quarto nível	2,27	0,94-5,52			2,32	0,97-5,53			1,49	0,58-3,87			2,12	0,86-5,28	
Variação do terceiro nível	1,76	0,81-3,81			1,50	0,65-3,35			0,79	0,24-2,63			1,52	0,67-3,45	
Variação do segundo nível	0,46	0,08-2,69			0,46	0,08-2,68			0,82	0,23-2,96			0,21	0,01-8,67	
Likelihood-ratio test	LR	Valor de p	LR (modelo vazio vs. modelo 1)	Valor de p	LR (modelo vazio vs. modelo 1)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	Valor de p
	-	-	7,83	0,098	7,83	0,098	34,20	<0,001	34,20	<0,001	132,0	<0,001	132,0	<0,001	<0,001

^aCasos índices foram excluídos das análises

^bHábitos de caça, pesca, dormir próximo à margem do rio ou atividades na mata após às 18 horas.

^cInfecção por *Plasmodium vivax* nos últimos seis meses anteriores à visita.

^dSintomas – febre, cefaleia, antraxia, lombalgia e mialgia – nos últimos 7 dias anteriores à visita.

^eAjuste por tipo de domicílio.

^fAjuste por variáveis do mesmo nível e por tipo de domicílio.

^gAjuste por variáveis do mesmo nível e do modelo 1.

^hAjuste por variáveis do modelo 2, exceto a variável independente "Malária progressa por *P. vivax*".

Tabela 21 - Análise multinível por regressão logística para infecção por *Plasmodium vivax* diagnosticado por método molecular, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Efeitos fixos	Modelo nulo ^a					Modelo 1 ^b					Modelo 2 ^c					Modelo 3 ^d				
	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p
Intercepto	5807	0,01	0,00-0,02	<0,001	5807	0,01	0,01-0,03	<0,001	5807	0,01	0,01-0,03	<0,001	5807	0,01	0,01-0,03	<0,001	5807	0,01	0,01-0,03	<0,001
Tipo de domicílio	5807				5807				5807				5807				5807			
Controles (>5 km)	2569	1			2569	1			2569	1			2569	1			2569	1		
Vizinhas (<3 km)	2663	1,93	1,25-2,99	0,003	2663	1,95	1,27-3,01	0,002	2663	1,95	1,27-3,01	0,002	2663	1,95	1,27-3,01	0,002	2663	1,95	1,27-3,01	0,002
Índices ^e	575	5,67	3,00-10,71	<0,001	575	5,95	3,15-11,21	<0,001	575	5,95	3,15-11,21	<0,001	575	5,95	3,15-11,21	<0,001	575	5,95	3,15-11,21	<0,001
Sexo	5807				5807				5807				5807				5807			
Feminino	2888	1			2888	1			2888	1			2888	1			2888	1		
Masculino	2919	1,13	0,85-1,49	0,406	2919	1,13	0,85-1,49	0,406	2919	1,09	0,81-1,45	0,570	2919	1,09	0,81-1,45	0,570	2919	1,09	0,81-1,45	0,582
Idade (meses)	5807	1,00	0,99-1,00	0,325	5807	1,00	0,99-1,00	0,325	5807	1,00	0,99-1,01	0,742	5807	1,00	0,99-1,01	0,633	5807	1,00	0,99-1,01	0,633
Nº moradores	5807				5807				5807				5807				5807			
<3	1622	1			1622	1			1622	1			1622	1			1622	1		
3-15	2090	0,66	0,41-1,06	0,087	2090	0,66	0,41-1,06	0,087	2090	0,77	0,49-1,23	0,274	2090	0,69	0,43-1,12	0,135	2090	0,69	0,43-1,12	0,135
>5	2095	0,69	0,41-1,17	0,168	2095	0,69	0,41-1,17	0,168	2095	0,77	0,47-1,26	0,301	2095	0,69	0,41-1,16	0,158	2095	0,69	0,41-1,16	0,158
Tempo de ocupação	5807	0,98			5807	0,98			5807	0,98			5807	0,98			5807	0,98		
Hábitos ^f	5806				5806				5806				5806				5806			
Não	3632	1			3632	1			3632	1			3632	1			3632	1		
Sim	2175	1,19	0,86-1,64	0,303	2175	1,19	0,86-1,64	0,303	2175	1,21	0,87-1,68	0,259	2175	1,21	0,87-1,68	0,259	2175	1,21	0,87-1,68	0,259
Infecção progressa por <i>P. vivax</i> ^g	5807				5807				5807				5807				5807			
Não	5548	1			5548	1			5548	1			5548	1			5548	1		
Sim	259	5,42	3,36-8,75	<0,001	259	5,42	3,36-8,75	<0,001	259	5,42	3,36-8,75	<0,001	259	5,42	3,36-8,75	<0,001	259	5,42	3,36-8,75	<0,001
Sintomas clínicos ^h	5807				5807				5807				5807				5807			
Assintomático	5334	1			5334	1			5334	1			5334	1			5334	1		
Sintomático	473	4,42	2,98-6,54	<0,001	473	4,42	2,98-6,54	<0,001	473	4,42	2,98-6,54	<0,001	473	4,42	2,98-6,54	<0,001	473	4,42	2,98-6,54	<0,001
Variação do quarto nível	0,48	0,20-1,19			0,47	0,19-1,17			0,36	0,13-0,97			0,39	0,14-1,06			0,93	0,46-1,86		
Variação do terceiro nível	1,05	0,55-1,98			0,96	0,49-1,88			0,55	0,20-1,56			0,93	0,46-1,86			1,75	1,06-2,87		
Variação do segundo nível	1,68	1,01-2,77			1,69	1,03-2,78			1,88	1,17-3,02			1,75	1,06-2,87			57,96	<0,001		
Likelihood-ratio test	LR	Valor de p	LR (modelo vazio vs. modelo 1)	Valor de p	LR (modelo vazio vs. modelo 1)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p
	-	-	4,39	0,356	4,39	0,356	50,61	<0,001	50,61	<0,001	57,96	<0,001	57,96	<0,001	57,96	<0,001	57,96	<0,001	57,96	<0,001

^aCasos índices foram excluídos das análises
^bHábitos de caça, pesca, dormir próximo à margem do rio ou atividades na mata após às 18 horas.
^cInfecção por *Plasmodium vivax* nos últimos seis meses anteriores à visita.
^dSintomas – febre, cefaleia, artralgia, lombalgia e mialgia – nos últimos 7 dias anteriores à visita.
^eAjuste por tipo de domicílio.
^fAjuste por variáveis do mesmo nível e por tipo de domicílio.
^gAjuste por variáveis do mesmo nível e do modelo 1.
^hAjuste por variáveis do modelo 2, exceto a variável independente “Malária progressa por *P. vivax*”.

A análise dos fatores associados à infecção por *P. vivax* para os diferentes painéis são apresentados.

Na visita inicial (**Tabelas 22 e 23**), em relação ao diagnóstico por microscopia convencional, os resultados evidenciam que a chance de se detectar um caso de malária, independente da sintomatologia clínica, reativo ao caso índice é cerca de 62 vezes aumentada ($P < 0,001$) nos domicílios índices quando comparado com os domicílios controles. Apesar de menor a probabilidade, os moradores dos domicílios índices apresentaram associação positiva com a infecção diagnosticada por qPCR (OR = 5,14; IC95%, 1,83-14,4; $P = 0,002$); não houve diferença estatisticamente significativa nos domicílios vizinhos em relação às residências controles no modelo completo ajustado (modelo 2) para microscopia de gota espessa e também para qPCR. As variáveis comportamentais não apresentaram associação com o desfecho em ambas as análises. Verificamos uma associação inversa entre o número maior de três moradores no domicílio com a presença de malária vivax. Na análise multinível ajustada para infecções diagnosticadas por qPCR, o recrutamento de indivíduos entre os meses de maio a julho apresentou associação positiva com o desfecho em comparação aos participantes que iniciaram o estudo entre os meses de janeiro a abril. Esse resultado deve-se provavelmente ao fato de ter ocorrido um aumento no número de casos de malária no município entre os meses de maio a julho. Indivíduos que relataram terem sido acometidos por malária vivax nos últimos seis meses anteriores à visita, quando ajustados pelas demais variáveis, apresentaram chance de 6,8 vezes maior (IC95%, 1,49-19,79; $P = 0,002$) de serem diagnosticados para *P. vivax* por microscopia e uma associação positiva com o diagnóstico positivo por qPCR (OR = 4,02; IC95%, 1,30-12,45; $P = 0,016$) em relação aos indivíduos que não relataram malária pregressa. Em um modelo ajustado para a análise da possível associação de sintomas clínicos com a presença de *P. vivax* (modelo 3), verificou-se que a chance de detecção do parasito é aumentada em portadores sintomáticos quando analisados pela microscopia convencional. Entretanto para o diagnóstico por qPCR a presença de sintomas não foi um fator associado estatisticamente com a presença do *P. vivax* indicando que o método identifica casos de malária, com uma maior probabilidade nos domicílios índices (OR = 5,96, IC95%, 2,14-16,60; $P = 0,001$) independentemente da condição clínica do indivíduo.

Tabela 22 - Análise multinível por regressão logística para infecção por *Plasmodium vivax* diagnosticado por microscopia de gota espessa – visita inicial, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Efeitos fixos	Modelo nulo ^a				Modelo 1 ^b				Modelo 2 ^c				Modelo 3 ^d			
	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p
Intercepto	1469	0,001	0,00-0,01	<0,001	1469	0,01	0,01-0,06	<0,001	1469	0,01	0,01-0,06	<0,001	1469	0,12	0,01-0,98	0,048
Tipo de domicílio	1469				1469				1469				1469			
	634	1			634	1			634	1			634	1		
	688	4,70	0,52-39,81	0,162	688	4,92	0,57-42,40	0,147	688	4,58	0,52-40,27	0,171	688	3,66	0,40-33,45	0,250
	147	67,2	7,12-623,2	<0,001	147	101,5	12,23-843,2	<0,001	147	62,03	7,02-547,7	<0,001	147	57,85	6,26-534,4	<0,001
Sexo	1469				1469				1469				1469			
	714	1			714	1			714	1			714	1		
Feminino	755				755	1,25	0,46-3,41	0,664	755	1,34	0,47-3,86	0,585	755	1,15	0,39-3,41	0,807
Masculino																
Idade (meses)	1496				1469	0,98	0,96-1,01	0,283	1469	0,99	0,96-1,02	0,360	1469	0,98	0,94-1,01	0,184
N° moradores	1469				1469				1469				1469			
	<3	1			398	1			398	1			398	1		
	3-15	523	0,06	0,01-0,32	523	0,07	0,01-0,42	0,003	523	0,06	0,01-0,42	0,003	523	0,06	0,01-0,37	0,002
	>5	548	0,15	0,05-0,52	548	0,21	0,06-0,76	0,017	548	0,13	0,03-0,53	0,005	548	0,13	0,03-0,53	0,005
Tempo de ocupação					1469	1,00	0,94-1,07	0,886	1469	1,01	0,94-1,09	0,783				
Recrutamento**	1469				1469				1469				1469			
	Jan-Abr	821	1		821	1			821	1			821	1		
	Mai-Jul	648	0,85	0,28-2,54	648	0,83	0,27-2,54	0,750	648	0,83	0,27-2,54	0,750	648	0,83	0,27-2,54	0,750
Hábitos*	1469				1469				1469				1469			
	Não	899	1		899	1			899	1			899	1		
	Sim	570	0,67	0,21-2,16	570	0,67	0,21-2,16	0,499	570	1,11	0,35-3,54	0,866	570	1,11	0,35-3,54	0,866
Infecção progressa por <i>P. vivax</i> ***					1469											
Não	1416	1			1416	1			1416	1			1416	1		
Sim	53	6,80	2,05-22,56	0,002	53	6,80	2,05-22,56	0,002	53	6,80	2,05-22,56	0,002	53	6,80	2,05-22,56	0,002
Sintomas clínicos****																
Assintomático	1469				1469				1469				1469			
Sintomático	1313				1313				1313				1313			
Variação do terceiro nível	2,01e-33	-			8,85e-41				6,64e-34	-			1,39e-34	-		
Variação do segundo nível	0,90	0,02-50,60			6,87e-32				1,26e-31	-			3,07e-32	-		
Likelihood-ratio test	LR															
	-				15,69				9,24				21,57			

^aCasos índices foram excluídos das análises
^bParticipantes foram recrutados no estudo entre os meses de janeiro a julho de 2013.
^cHábitos de caça, pesca, dormir próximo à margem do rio ou atividades na mata após às 18 horas.
^dInfecção por *Plasmodium vivax* nos últimos seis meses anteriores à visita.
^eSintomas – febre, cefaleia, artralgia, lombalgia e mialgia – nos últimos 7 dias anteriores à visita.
^fAjuste por tipo de domicílio. ^gAjuste por variáveis do mesmo nível e por tipo de domicílio. ^hAjuste por variáveis do mesmo nível e do modelo 1. ⁱAjuste por variáveis do modelo 2, exceto infecção progressa por *P. vivax*.

Tabela 23 - Análise multinível por regressão logística para infecção por *Plasmodium vivax* diagnosticado por qPCR – visita inicial, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Efeitos fixos	Modelo nulo ^a				Modelo 1 ^b				Modelo 2 ^c				Modelo 3 ^d			
	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	h	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p
Intercepto	1452	0,02	0,01-0,04	<0,001	1452	0,03	0,01-0,10	<0,001	1452	0,02	0,01-0,06	<0,001	1452	0,02	0,01-0,06	<0,001
<i>Tipo de domicílio</i>	1452				1452				1452				1452			
Controles (>5 km)	631	1			631	1			631	1			631	1		
Vizinhos (<3 km)	674	0,76	0,36-1,59	0,464	674	0,80	0,38-1,61	0,560	674	0,85	0,41-1,77	0,657	674	0,84	0,40-1,76	0,648
Índice ^e	147	5,16	1,89-14,1	0,001	147	6,08	2,17-16,42	<0,001	147	5,14	1,83-14,4	0,002	147	5,96	2,14-16,60	0,001
<i>Sexo</i>	1452				1452				1452				1452			
Feminino	710	1			710	1			710	1			710	1		
Masculino	742	1,43	0,84-2,44	0,186	742	1,32	0,76-2,29	0,321	742	1,30	0,75-2,25	0,349	742	1,30	0,75-2,25	0,349
<i>Idade (meses)</i>	1452	0,99	0,98-1,01	0,194	1452	0,98	0,97-1,00	0,082	1452	0,98	0,97-1,00	0,082	1452	0,98	0,97-1,00	0,082
<i>Nº moradores</i>	1452				1452				1452				1452			
<3	394	1			394	1			394	1			394	1		
3-15	519	0,39	0,17-0,90	0,028	519	0,40	0,17-0,92	0,031	519	0,39	0,17-0,88	0,024	519	0,39	0,17-0,88	0,024
> 5	539	0,33	0,14-0,80	0,015	539	0,33	0,14-0,80	0,014	539	0,31	0,13-0,77	0,011	539	0,31	0,13-0,77	0,011
<i>Tempo de ocupação</i>	1452				1452				1452				1452			
Recrutamento ^g	1452				1452				1452				1452			
Jan-Abr	812	1			812	1			812	1			812	1		
Mai-Jul	640	3,23	1,25-8,38	0,016	640	3,11	1,21-7,97	0,018	640	3,11	1,21-7,97	0,018	640	3,11	1,21-7,97	0,018
<i>Hábitos^h</i>	1452				1452				1452				1452			
Não	890	1			890	1			890	1			890	1		
Sim	562	1,42	0,78-2,60	0,251	562	1,48	0,81-2,70	0,205	562	1,48	0,81-2,70	0,205	562	1,48	0,81-2,70	0,205
<i>Infecção progressa por P. vivax^h</i>	1452				1452				1452				1452			
Não	1399	1			1399	1			1399	1			1399	1		
Sim	53	4,02	1,30-12,45	0,016	53	4,02	1,30-12,45	0,016	53	4,02	1,30-12,45	0,016	53	4,02	1,30-12,45	0,016
<i>Sintomas clínicos^h</i>	1452				1452				1452				1452			
Assintomático	1296	1			1296	1			1296	1			1296	1		
Sintomático	156	1,92	0,86-4,28	0,111	156	1,92	0,86-4,28	0,111	156	1,92	0,86-4,28	0,111	156	1,92	0,86-4,28	0,111
<i>Variação do terceiro nível</i>	1,30	0,50-3,37	-	-	1,28	0,50-3,29	-	-	1,06	0,37-2,99	-	-	1,01	0,35-2,92	-	-
<i>Variação do segundo nível</i>	2,80	1,38-5,70	-	-	2,56	1,24-5,29	-	-	2,42	1,14-5,13	-	-	2,48	1,18-5,21	-	-
<i>Likelihood-ratio test</i>	LR	Valor de p	LR (modelo vazio vs. modelo 1)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p
	-	-	9,64	0,047	12,41	0,015	9,43	0,05	12,41	0,015	9,43	0,05	12,41	0,015	9,43	0,05

^aCasos índices foram excluídos das análises

^bParticipantes do estudo foram recrutados entre os meses de janeiro a julho de 2013.

^cHábitos de caça, pesca, dormir próximo à margem do rio ou atividade na mata após às 18 horas.

^dInfecção por *Plasmodium vivax* nos últimos 6 meses.

^eSintomas – febre, cefaleia, artralgia, mialgia e lombalgia - nos últimos 7 dias anteriores à visita.

^fAjuste por tipo de domicílio. ^gAjuste por variáveis do mesmo nível e por tipo de domicílio. ^hAjuste por variáveis do mesmo nível e variáveis do modelo 1. ⁱAjuste por variáveis do modelo 2, exceto variável independente infecção progressa por *P. vivax*.

Nas análises multiníveis ajustadas nos seguimentos de RCD nos 30 dias e 60 dias para infecção por *P. vivax* diagnosticadas por microscopia de gota espessa as observações dos domicílios controles (> 5 km) foram excluídas devido à ausência de informações para a variável desfecho, ou seja, não houve casos de malária diagnosticados pelo método convencional nesses domicílios durante as visitas citadas. Na visita de 30 dias a análise ajustada por variáveis demográficas e domiciliares apontou uma maior probabilidade (OR = 4,73; IC95%; 1,14-19,72; $P = 0,033$) de detectar casos de malária por microscopia de gota espessa entre os demais moradores dos domicílios índices em comparação com os domicílios vizinhos (modelo 1); entretanto, quando a análise foi ajustada por covariáveis comportamentais e de morbidade não se verificou associação estatisticamente significativa entre o tipo de domicílio e o desfecho. Houve uma associação positiva estatisticamente significativa ($P = 0,025$) entre o relato de malária pregressa e sintomas clínicos com o diagnóstico positivo de malária vivax por microscopia. Similarmente, a análise de fatores associados ao diagnóstico positivo para malária vivax apontou uma maior chance em se diagnosticar o parasito entre os indivíduos moradores dos domicílios índices somente quando o modelo foi ajustado por variáveis domiciliares e demográficas (modelo 1). Cada ano adicional de residência na localidade foi associado com uma redução de 4% (95%IC, 1-7%) na probabilidade para microscopia positiva no modelo completo ajustado, de forma independentemente do tipo de domicílio; histórico de malária pregressa foi associado de forma positiva com o desfecho (OR = 2,68; IC95%, 1,13-6,37; $P = 0,0260$). Indivíduos sintomáticos apresentaram associação estatisticamente significativa tanto com o diagnóstico por microscopia como por qPCR, independentemente da distância de moradia para o caso índice (**Tabelas 24 e 25**).

Durante o monitoramento de 60 dias, não houve diferença estatisticamente significativa em relação à detecção de casos de malária por microscopia entre domicílios índices e vizinhos na análise ajustada. Porém verificou-se uma chance aumentada em cerca de 12 vezes em se detectar casos de *P. vivax* em indivíduos que apresentaram infecção de malária confirmada nos últimos seis meses (modelo 2), além de uma maior probabilidade em casos sintomáticos e uma associação inversa entre um maior tempo de ocupação e o desfecho (modelo 3) (**Tabela 26**). Em relação ao diagnóstico molecular verificou-se uma chance de aproximadamente 12 vezes maior de se detectar malária vivax entre os moradores dos domicílios índices e de 13 vezes aumentada nos domicílios vizinhos quando comparados aos indivíduos

controles. Indivíduos que relataram malária pregressa (OR = 13,89; IC95%, 6,00-32,12; $P < 0,001$) estavam associados positivamente com a presença da infecção. Observa-se a partir da construção do modelo ajustado para a variável “sintomas clínicos (modelo 3) há um aumento significativo aumento na probabilidade de diagnosticar o *P. vivax* em indivíduos que apresentavam sintomas (OR = 10,02; IC95%, 4,42-22,69) e residiam tanto em domicílios índices (OR = 33,62; $P < 0,001$) como nas residências vizinhas (OR = 15,22; $P < 0,001$) (**Tabela 27**).

Tabela 24 - Análise multinível por regressão logística para infecção por *Plasmodium vivax* diagnosticado por microscopia de gota espessa – visita de 30 dias, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Efeitos fixos	Modelo nulo ^a					Modelo 2 ^b					Modelo 3 ^d					
	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p
Intercepto	790	0,003	0,001-0,03	<0,001	790	0,01	0,01-0,06	<0,001	790	0,01	0,01-0,05	<0,001	790	0,001	0,001-0,03	<0,001
Tipo de domicílio	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-
Controles (>5 km) [*]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vizinhos (<3 km)	647	1	-	-	647	1	-	-	647	1	-	-	647	1	-	-
Índice [*]	143	3,82	0,95-15,32	0,058	143	4,73	1,14-19,72	0,033	143	3,11	0,132	0,71-13,59	143	3,50	0,53-23,12	0,194
Sexo	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-
Feminino	378	1	-	-	378	1	-	-	378	1	-	-	378	1	-	-
Masculino	412	2,01	0,68-5,91	0,204	412	1,78	0,60-5,36	0,293	412	2,26	0,55-9,21	0,257	412	2,26	0,55-9,21	0,257
Idade (meses)	790	1,00	0,97-1,03	0,956	790	1,01	0,97-1,04	0,720	790	1,01	0,97-1,04	0,720	790	1,00	0,96-1,05	0,863
Nº moradores	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-
<3	192	1	-	-	192	1	-	-	192	1	-	-	192	1	-	-
3-15	318	0,20	0,04-1,07	0,060	318	0,26	0,05-1,36	0,109	318	0,24	0,03-2,12	0,199	318	0,24	0,03-2,12	0,199
> 5	280	0,31	0,06-1,57	0,158	280	0,42	0,08-2,07	0,284	280	0,21	0,02-1,81	0,155	280	0,21	0,02-1,81	0,155
Tempo de ocupação	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-
Hábitos [*]	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-
Não	511	1	-	-	511	1	-	-	511	1	-	-	511	1	-	-
Sim	279	1,06	0,32-3,49	0,920	279	1,06	0,32-3,49	0,920	279	1,02	0,23-4,46	0,979	279	1,02	0,23-4,46	0,979
Infecção progressa por <i>P. vivax</i> ^{##}	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-
Não	740	1	-	-	740	1	-	-	740	1	-	-	740	1	-	-
Sim	50	5,04	1,22-20,78	0,025	50	5,04	1,22-20,78	0,025	50	5,04	1,22-20,78	0,025	50	5,04	1,22-20,78	0,025
Sintomas clínicos ^{###}	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-	790	-	-	-
Assintomático	708	1	-	-	708	1	-	-	708	1	-	-	708	1	-	-
Sintomático	82	90,47	9,90-826,6	<0,001	82	90,47	9,90-826,6	<0,001	82	90,47	9,90-826,6	<0,001	82	90,47	9,90-826,6	<0,001
Variação do terceiro nível	1,77	0,27-11,60	2,16	0,38-12,20	1,74	0,26-11,91	1,59	0,11-23,15	1,74	0,26-11,91	1,59	0,11-23,15	1,59	0,11-23,15	1,59	0,11-23,15
Variação do segundo nível	2,20	0,40-12,26	2,03	0,40-10,58	1,96	0,35-10,95	1,96	0,35-10,95	1,96	0,35-10,95	1,96	0,35-10,95	1,96	0,35-10,95	1,96	0,35-10,95
Likelihood-ratio test	LR	Valor de p	LR (modelo 1) vs modelo 1)	Valor de p	LR (modelo 1) vs modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1) vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1) vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1) vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1) vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1) vs. modelo 3)	Valor de p
-	-	-	6,58	0,160	5,74	0,125	42,99	<0,001	42,99	<0,001	42,99	<0,001	42,99	<0,001	42,99	<0,001

^aCasos índices foram excluídos das análises

^{*}As observações dos domicílios controles (> 5 km) foram excluídas das análises devido à ausência de informações para a variável desfecho.

^{**}Participantes do estudo foram recrutados entre os meses de janeiro a julho de 2013.

^{##}Hábitos de caça, pesca, dormir próximo à margem do rio ou atividades na mata após as 18 horas.

^{###}Infecção por *Plasmodium vivax* nos últimos 6 meses.

^{####}Sintomas – febre, cefaleia, artralgia, mialgia e lombalgia – nos últimos 7 dias anteriores à visita.

^{#####}Ajuste por variáveis do mesmo nível e por tipo de domicílio. ^{#####}Ajuste por variáveis do mesmo nível e do modelo 1. ^{#####}Ajuste por variáveis do modelo 2, exceto a variável independente Malária progressa por *P. vivax*.

Tabela 25 - Análise multinível por regressão logística para infecção por *Plasmodium vivax* diagnosticado por diagnóstico molecular – **visita de 30 dias**, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Efeitos fixos	Modelo nulo ^a					Modelo 2 ^b					Modelo 3 ^d				
	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	Valor de p
Intercepto	1414	0,03	0,01-0,05	<0,001	1414	0,04	0,01-0,09	<0,001	1414	0,05	0,02-0,11	<0,001	1414	0,04	0,02-0,11
<i>Tipo de domicílio</i>	1414				1414				1414				1414		
Controles (> 5 km)	626	1			626	1			626	1			626	1	
Vizinhas (< 3 km)	645	1,32	0,72-2,43	0,369	645	1,29	0,70-2,327	0,421	645	1,07	0,57-1,98	0,840	645	0,96	0,50-1,82
Índices*	143	3,42	1,42-8,22	0,006	143	3,40	1,40-8,25	0,007	143	2,27	0,92-5,58	0,074	143	2,37	0,95-5,88
<i>Sexo</i>	1414				1414				1414				1414		
Feminino	700	1			700	1			700	1			700	1	
Masculino	714	0,97	0,61-1,54	0,902	714	0,99	0,62-1,59	0,971	714	0,99	0,61-1,61	0,984	714	0,99	0,61-1,61
<i>Idade (meses)</i>	1414				1414				1414				1414		
Nº moradores	1414				1414				1414				1414		
<3	397	1			397	1			397	1			397	1	
3-15	517	0,93	0,46-1,85	0,827	517	1,05	0,53-2,07	0,897	517	1,04	0,52-2,10	0,909	517	1,04	0,52-2,10
> 5	500	0,76	0,36-1,61	0,473	500	0,84	0,40-1,76	0,651	500	0,80	0,38-1,71	0,565	500	0,80	0,38-1,71
<i>Tempo de ocupação</i>	1414				1414				1414				1414		
Hábitos [#]	1414				1414				1414				1414		
Não	881	1			881	1			881	1			881	1	
Sim	533	0,95	0,56-1,61	0,838	533	0,95	0,56-1,61	0,838	533	0,95	0,55-1,63	0,852	533	0,95	0,55-1,63
<i>Infecção pregressa por P. vivax^{##}</i>	1414				1414				1414				1414		
Não	1349	1			1349	1			1349	1			1349	1	
Sim	65	2,68	1,13-6,37	0,026	65	2,68	1,13-6,37	0,026	65	2,68	1,13-6,37	0,026	65	2,68	1,13-6,37
<i>Sintomas clínicos^{###}</i>	1414				1414				1414				1414		
Assintomático	1308	1			1308	1			1308	1			1308	1	
Sintomático	106	3,98	1,93-8,22	<0,001	106	3,98	1,93-8,22	<0,001	106	3,98	1,93-8,22	<0,001	106	3,98	1,93-8,22
<i>Variação do terceiro nível</i>	0,18		0,01-2,40		0,16		0,01-2,71		0,09		0,01-8,41		0,07		0,01-27,90
<i>Variação do segundo nível</i>	1,80		0,86-3,76		1,77		0,85-3,71		1,61		0,76-3,44		1,84		0,89-3,83
<i>Likelihood-ratio test</i>	LR			Valor de p	LR (modelo vazio vs modelo 1)			Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)			Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)		Valor de p
	-			-	1,30		0,862	0,025	9,35		18,05	<0,001	18,05		<0,001

^aCasos índices foram excluídos das análises

^bParticipantes do estudo foram recrutados entre os meses de janeiro a julho de 2013.

^cHábitos de caça, pesca, dormir próximo à margem do rio ou atividades na mata após as 18 horas.

^dInfecção por *Plasmodium vivax* nos últimos 6 meses.

^eSintomas – febre, cefaleia, artralgia, mialgia e lombalgia – nos últimos 7 dias anteriores à visita.

^fAjuste por variáveis do mesmo nível e por tipo de domicílio. ^gAjuste por variáveis do mesmo nível e do modelo 1. ^hAjuste por variáveis do mesmo nível e do modelo 2, exceto a variável independente *Malária progressa* por *P. vivax*.

Tabela 26 - Análise multinível por regressão logística para infecção por *Plasmodium vivax* diagnosticado por microscopia de gota espessa – visita de 60 dias, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Efeitos fixos	Modelo nulo ^a					Modelo 2 ^b					Modelo 3 ^d				
	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	Valor de p
Intercepto	820	0,01	0,01-0,04	<0,001	820	0,01	0,01-0,06	<0,001	820	0,01	0,01-0,04	<0,001	820	0,01	<0,001
<i>Tipo de domicílio</i>	820				820				820				820		
Controles (>5 km) ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vizinhos (<3 km)	679	1	-	-	679	1	-	-	679	1	-	-	679	1	-
Índice [*]	141	1,91	0,71-5,18	0,202	141	1,87	0,68-5,13	0,224	141	0,99	0,36-2,72	0,979	141	2,31	0,84-6,36
<i>Sexo</i>	820				820				820				820		
Feminino	403	1	-	-	403	1	-	-	403	1	-	-	403	1	-
Masculino	417	1,06	0,52-2,19	0,876	417	1,06	0,52-2,25	0,888	417	1,02	0,46-2,27	0,953	417	1,02	0,46-2,27
<i>Idade (meses)</i>	820				820				820				820		
Nº moradores	820	1,00	0,98-1,03	0,711	820	1,01	0,99-1,04	0,282	820	1,01	0,99-1,04	0,311	820	1,01	0,99-1,04
<3	206	1	-	-	206	1	-	-	206	1	-	-	206	1	-
3-15	315	0,72	0,23-2,26	0,568	315	1,37	0,44-4,30	0,587	315	0,88	0,27-2,88	0,835	315	0,88	0,27-2,88
>5	299	1,45	0,46-4,57	0,521	299	2,88	0,92-9,02	0,069	299	1,58	0,47-5,25	0,456	299	1,58	0,47-5,25
<i>Tempo de ocupação</i>	820				820				820				820		
Hábitos [#]	820	0,93	0,87-1,00	0,050	820	0,93	0,87-1,00	0,050	820	0,92	0,85-0,99	0,047	820	0,92	0,85-0,99
Não	535	1	-	-	535	1	-	-	535	1	-	-	535	1	-
Sim	285	1,07	0,45-2,52	0,876	285	1,07	0,45-2,52	0,876	285	0,95	0,39-2,30	0,906	285	0,95	0,39-2,30
<i>Infecção pregressa por P. vivax^{##}</i>	820				820				820				820		
Não	752	1	-	-	752	1	-	-	752	1	-	-	752	1	-
Sim	68	11,96	4,78-29,92	<0,001	68	11,96	4,78-29,92	<0,001	68	11,96	4,78-29,92	<0,001	68	11,96	<0,001
<i>Sintomas clínicos^{###}</i>	820				820				820				820		
Assintomático	725	1	-	-	725	1	-	-	725	1	-	-	725	1	-
Sintomático	95	12,14	4,93-29,88	<0,001	95	12,14	4,93-29,88	<0,001	95	12,14	4,93-29,88	<0,001	95	12,14	<0,001
<i>Variação do terceiro nível</i>	1,57	0,47-5,20	1,68	0,52-5,42	1,68	0,52-5,42	1,68	0,52-5,42	1,68	0,52-5,42	1,68	0,52-5,42	1,68	0,52-5,42	1,68
<i>Variação do segundo nível</i>	1,12	0,25-4,96	0,99	0,20-5,04	0,99	0,20-5,04	0,99	0,20-5,04	0,99	0,20-5,04	0,99	0,20-5,04	0,99	0,20-5,04	0,99
<i>Likelihood-ratio test</i>	LR	Valor de p	LR (modelo vazio vs modelo 1)	Valor de p	LR (modelo vazio vs modelo 1)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)
	-	-	2,01	0,734	2,01	0,734	32,31	<0,001	32,31	<0,001	36,61	<0,001	36,61	<0,001	<0,001

^aCasos índices foram excluídos das análises

⁺As observações dos domicílios controles (> 5 km) foram excluídas das análises devido à ausência de informações para a variável desfecho.

[#]Hábitos de caça, pesca, dormir próximo à margem do rio ou atividades na mata após as 18 horas.

^{##}Infecção por *Plasmodium vivax* nos últimos 6 meses.

^{###}Sintomas – febre, cefaleia, artralgia, mialgia e lombalgia – nos últimos 7 dias anteriores à visita.

^aAjuste por variáveis do mesmo nível e por tipo de domicílio. ^bAjuste por variáveis do mesmo nível e do modelo 1. ^cAjuste por variáveis do modelo 2, exceto a variável independente Malária pregressa por *P. vivax*.

Tabela 27 - Análise multinível por regressão logística para infecção por *Plasmodium vivax* diagnosticado por qPCR – visita de 60 dias, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Efeitos fixos	Modelo nulo ^a					Modelo 2 ^c					Modelo 3 ^d				
	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	Valor de p
<i>Intercepto</i>	1433	0,001	0,001-0,03	<0,001	1433	0,001	0,001-0,10	<0,001	1433	0,001	0,001-0,01	<0,001	1433	0,001	0,01-0,09
<i>Tipo de domicílio</i>	1433				1433				1433				1433		
Controles (> 5 km)	634	1			634	1			634	1			634	1	
Vizinhas (< 3 km)	660	23,90	5,21-109,7	<0,001	660	24,81	5,37-114,7	<0,001	660	13,0	2,94-57,48	0,001	660	15,22	3,35-69,28
Índices ^e	139	42,26	7,83-227,8	<0,001	139	46,68	8,48-257,0	<0,001	139	11,69	2,21-61,76	0,004	139	33,62	6,31-179,2
<i>Sexo</i>	1433				1433				1433				1433		
Feminino	721	1			721	1			721	1			721	1	
Masculino	712	1,15	0,60-2,23	0,671	712	1,23	0,62-2,46	0,557	712	1,09	0,54-2,20	0,821	712	1,09	0,54-2,20
<i>Idade (meses)</i>	1433	0,99	0,97-1,01	0,572	1433	1,00	0,98-1,02	0,899	1433	1,00	0,98-1,02	0,988	1433	1,00	0,98-1,02
<i>Nº moradores</i>	1433				1433				1433				1433		
<3	406	1			406	1			406	1			406	1	
3-15	514	0,49	0,18-1,36	0,173	514	0,96	0,35-2,63	0,938	514	0,56	0,21-1,58	0,282	514	0,56	0,21-1,58
>5	513	0,83	0,31-2,23	0,710	513	1,63	0,61-4,35	0,330	513	0,81	0,30-2,19	0,675	513	0,81	0,30-2,19
<i>Tempo de ocupação</i>	1433	0,96	0,91-1,02	0,162	1433	0,96	0,91-1,02	0,162	1433	0,96	0,91-1,02	0,177	1433	0,96	0,91-1,02
<i>Hábitos*</i>	1433				1433				1433				1433		
Não	903	1			903	1			903	1			903	1	
Sim	530	0,94	0,43-2,06	0,880	530	0,94	0,43-2,06	0,880	530	0,96	0,43-2,12	0,914	530	0,96	0,43-2,12
<i>Infecção pregressa por P. vivax^{##}</i>	1433				1433				1433				1433		
Não	1355	1			1355	1			1355	1			1355	1	
Sim	78	13,89	6,00-32,12	<0,001	78	13,89	6,00-32,12	<0,001	78	13,89	6,00-32,12	<0,001	78	13,89	6,00-32,12
<i>Sintomas clínicos^{###}</i>	1433				1433				1433				1433		
Assintomático	1317	1			1317	1			1317	1			1317	1	
Sintomático	116	10,02	4,42-22,69	<0,001	116	10,02	4,42-22,69	<0,001	116	10,02	4,42-22,69	<0,001	116	10,02	4,42-22,69
<i>Variação do terceiro nível</i>	2,16	0,79-5,94			2,28	0,83-6,24			1,27	0,41-3,95			2,37	0,87-6,46	
<i>Variação do segundo nível</i>	0,63	0,09-4,25			0,60	0,08-4,28			0,09	-			0,23	0,002-19,2	
<i>Likelihood-ratio test</i>	LR	Valor de p	LR (modelo vazio vs modelo 1)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)
	-	-	2,63	0,622	39,05	0,622	32,71	<0,001	32,71	<0,001	32,71	<0,001	32,71	<0,001	<0,001

^aCasos índices foram excluídos das análises

^bHábitos de caça, pesca, dormir próximo à margem do rio ou atividades na mata após as 18 horas.

^cInfecção por *Plasmodium vivax* nos últimos 6 meses.

^dSintomas – febre, cefaleia, artralgia, mialgia e lombalgia – nos últimos 7 dias anteriores à visita.

^eAjuste por tipo de domicílio. ^fAjuste por variáveis do mesmo nível e por tipo de domicílio. ^gAjuste por variáveis do mesmo nível e do modelo 1. ^hAjuste por variáveis do modelo 2, exceto a variável independente Malária pregressa por *P. vivax*.

Em relação ao seguimento de 180 dias após a visita inicial verificamos que a chance de se diagnosticar casos de malária, por microscopia convencional, é estatisticamente associada de forma positiva tanto para os domicílios índices como para os domicílios vizinhos em relação aos domicílios controles, quando a análise foi ajustada por variáveis domiciliares e demográficas (modelo 1). Entretanto, verifica-se que ao inserirmos no modelo covariáveis comportamentais e de morbidade, somente há associação estatisticamente significativa em relação aos moradores dos domicílios vizinhos (OR = 7,29; IC95%, 1,34-39,63; $P = 0,022$) quando comparados com os domicílios controles (modelo 2). Novamente, histórico de malária pregressa foi associado com o desfecho. O modelo 3 relata que há uma maior probabilidade estatisticamente significativa de se diagnosticar malária em indivíduos sintomáticos e que residem tanto nos domicílios índices (OR = 8,80; $P = 0,025$) quanto nos moradores vizinhos (OR = 5,35; $P = 0,044$) (**Tabela 28**). Em relação ao exame de qPCR, houve uma maior chance de se detectar malária entre os moradores de domicílios índices (OR = 6,59; IC95%, 2,18-19,94; $P = 0,001$) e moradores vizinhos (OR = 5,00; IC95%, 2,13-11,69; $P < 0,001$) quando comparados aos residentes nos domicílios controles (modelo 2). Ao inserirmos na análise variáveis comportamentais e de morbidade, verificou-se associação positiva estatisticamente positiva ($P < 0,05$) entre moradores de domicílios vizinhos, malária pregressa e a idade dos participantes; o incremento de cada mês na idade contribuiu com um aumento de 2% (95%IC, 0-4%) na detecção de malária vivax pelo método molecular (modelo 2). Novamente, a presença de sintomas clínicos estava associada de forma positiva ($P < 0,05$) com o desfecho, assim como a idade dos moradores de domicílios índices e vizinhos (modelo 3) (**Tabela 29**).

Tabela 28 - Análise multinível por regressão logística para infecção por *Plasmodium vivax* diagnosticado por microscopia de gota espessa – visita de 180 dias, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Efeitos fixos	Modelo nulo ^a					Modelo 1 ^b					Modelo 2 ^c					Modelo 3 ^d				
	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p
Intercepto	1513	0,001	0,001-0,01	<0,001	1513	0,004	0,001-0,04	<0,001	1513	0,006	0,00-0,04	<0,001	1513	0,001	0,001-0,01	<0,001	1513	0,001	0,001-0,01	<0,001
<i>Tipo de domicílio</i>	1513				1513				1513				1513				1513			
Controles (>5 km)	678	1			678	1			678	1			678	1			678	1		
Vizinhos (<3 km)	689	13,93	2,69-72,23	0,002	689	14,25	2,69-75,60	0,002	689	7,29	1,34-39,63	0,022	689	5,35	1,04-27,43	0,044	689	5,35	1,04-27,43	0,044
Índices*	146	18,87	2,70-132,0	0,003	146	19,77	2,77-140,9	0,003	146	5,64	0,71-45,08	0,103	146	8,80	1,32-58,69	0,025	146	8,80	1,32-58,69	0,025
<i>Sexo</i>	1513				1513				1513				1513				1513			
Feminino	757	1			757	1			757	1			757	1			757	1		
Masculino	756	0,88			756	0,88	0,39-2,00	0,760	756	0,81	0,34-1,96	0,647	756	0,97	0,39-2,40	0,950	756	0,97	0,39-2,40	0,950
<i>Idade (meses)</i>	1513				1513				1513				1513				1513			
N° moradores	1513				1513				1513				1513				1513			
<3	427	1			427	1			427	1			427	1			427	1		
3-15	541	0,86			541	0,86	0,24-3,07	0,812	541	1,34	0,37-4,95	0,656	541	0,92	0,26-3,22	0,900	541	0,92	0,26-3,22	0,900
>5	545	1,00			545	1,00	0,25-3,91	0,999	545	1,25	0,31-5,05	0,757	545	0,84	0,22-3,16	0,798	545	0,84	0,22-3,16	0,798
<i>Tempo de ocupação</i>	1513				1513				1513				1513				1513			
Hábitos [#]	1513				1513				1513				1513				1513			
Não	961	1			961	1			961	1			961	1			961	1		
Sim	552	1,15			552	1,15	0,43-3,09	0,781	552	1,11	0,40-3,06	0,841	552	1,11	0,40-3,06	0,841	552	1,11	0,40-3,06	0,841
<i>Infecção progressa por P. vivax^{##}</i>	1513				1513				1513				1513				1513			
Não	1449	1			1449	1			1449	1			1449	1			1449	1		
Sim	64	9,49			64	9,49	2,71-33,26	<0,001	64	9,49	2,71-33,26	<0,001	64	9,49	2,71-33,26	<0,001	64	9,49	2,71-33,26	<0,001
<i>Sintomas clínicos^{###}</i>	1513				1513				1513				1513				1513			
Assintomático	1414	1			1414	1			1414	1			1414	1			1414	1		
Sintomático	99	20,92			99	20,92	7,90-55,48	<0,001	99	20,92	7,90-55,48	<0,001	99	20,92	7,90-55,48	<0,001	99	20,92	7,90-55,48	<0,001
<i>Variação do terceiro nível</i>	2,50	0,67-9,37			2,54	0,69-9,52			2,54	0,69-9,52			2,54	0,69-9,52			2,54	0,69-9,52		
<i>Variação do segundo nível</i>	1,70	0,34-8,57			1,73	0,34-8,81			1,73	0,34-8,81			1,73	0,34-8,81			1,73	0,34-8,81		
<i>Likelihood-ratio test</i>	LR	Valor de p	LR (modelo vazio vs modelo 1)	Valor de p	LR (modelo vazio vs modelo 1)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs. modelo 3)	Valor de p
	-	-	0,22	0,994	0,22	0,994	18,09	<0,001	18,09	<0,001	44,11	<0,001	44,11	<0,001	44,11	<0,001	44,11	<0,001	44,11	<0,001

*Casos índices foram excluídos das análises

[#]Hábitos de caça, pesca, dormir próximo à margem do rio ou atividades na mata após as 18 horas.

^{##}Infecção por *Plasmodium vivax* nos últimos 6 meses.

^{###}Sintomas – febre, cefaleia, artralgia, mialgia e lombalgia – nos últimos 7 dias anteriores à visita.

^aAjuste por tipo de domicílio. ^bAjuste por variáveis do mesmo nível e por tipo de domicílio. ^cAjuste por variáveis do mesmo nível e do modelo 1. ^dAjuste por variáveis do modelo 2, exceto a variável independente Malária progressa por *P. vivax*.

Tabela 29 - Análise multinível por regressão logística para infecção por *Plasmodium vivax* diagnosticado por qPCR – visita de 180 dias, 2013. Município de Acrelândia, Acre.

Efeitos fixos	Modelo nulo ^a					Modelo 1 ^b					Modelo 2 ^c					Modelo 3 ^d				
	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p	n	Odds ratio	IC (95%)	Valor de p
Intercepto	1508	0,01	0,01-0,02	<0,001	1508	0,002	0,001-0,02	<0,001	1508	0,003	0,001-0,01	<0,001	1508	0,003	0,001-0,02	<0,001	1508	0,003	0,001-0,02	<0,001
<i>Tipo de domicílio</i>	1508				1508				1508				1508				1508			
Controles (> 5 km)	676	1			676	1			676	1			676	1			676	1		
Vizinhos (< 3 km)	686	4,46	1,94-10,23	<0,001	686	5,00	2,13-11,69	<0,001	686	2,89	1,22-6,85	0,016	686	3,10	1,33-7,25	0,009	686	3,10	1,33-7,25	0,009
Índices ^e	146	6,34	2,13-18,88	0,001	146	6,59	2,18-19,94	0,001	146	1,90	0,56-6,38	0,300	146	4,47	1,52-13,16	0,007	146	4,47	1,52-13,16	0,007
<i>Sexo</i>	1508				1508				1508				1508				1508			
Feminino	757	1			757	1			757	1			757	1			757	1		
Masculino	751	1,24			751	1,24	0,69-2,22	0,480	751	1,13	0,60-2,12	0,709	751	1,32	0,71-2,47	0,378	751	1,32	0,71-2,47	0,378
<i>Idade (meses)</i>	1508				1508				1508				1508				1508			
<i>Nº moradores</i>	1508				1508				1508				1508				1508			
<3	425	1			425	1			425	1			425	1			425	1		
3-15	540	1,06			540	1,06	0,44-2,55	0,898	540	1,62	0,66-3,96	0,292	540	1,12	0,47-2,67	0,803	540	1,12	0,47-2,67	0,803
>5	543	1,82			543	1,82	0,47-4,51	0,194	543	2,16	0,86-5,44	0,102	543	1,67	0,69-4,05	0,255	543	1,67	0,69-4,05	0,255
<i>Tempo de ocupação</i>	1508				1508				1508				1508				1508			
<i>Hábitos^f</i>	1508				1508				1508				1508				1508			
Não	958	1			958	1			958	1			958	1			958	1		
Sim	550	1,28			550	1,28	0,65-2,52	0,474	550	1,23	0,63-2,41	0,551	550	1,23	0,63-2,41	0,551	550	1,23	0,63-2,41	0,551
<i>Infecção pregressa por P. vivax^g</i>	1508				1508				1508				1508				1508			
Não	1445	1			1445	1			1445	1			1445	1			1445	1		
Sim	63	14,30			63	14,30	5,78-35,36	<0,001	63	14,30	5,78-35,36	<0,001	63	14,30	5,78-35,36	<0,001	63	14,30	5,78-35,36	<0,001
<i>Sintomas clínicos^{h,i,j}</i>	1508				1508				1508				1508				1508			
Assintomático	1409	1			1409	1			1409	1			1409	1			1409	1		
Sintomático	99	8,12			99	8,12	3,98-16,55	<0,001	99	8,12	3,98-16,55	<0,001	99	8,12	3,98-16,55	<0,001	99	8,12	3,98-16,55	<0,001
<i>Variação do terceiro nível</i>	0,77	0,22-2,69			0,90	0,27-2,95			0,31	0,03-3,01			0,52	0,11-2,33			0,52	0,11-2,33		
<i>Variação do segundo nível</i>	0,95	0,19-4,76			0,88	0,16-4,93			0,87	0,15-5,06			0,54	0,05-5,65			0,54	0,05-5,65		
<i>Likelihood-ratio test</i>	LR	Valor de p	LR (modelo vazio vs modelo 1)	Valor de p	LR (modelo 1 vs modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs modelo 3)	Valor de p	LR (modelo 1 vs modelo 2)	Valor de p	LR (modelo 1 vs modelo 3)	Valor de p
	-	-	5,60	0,231	39,54	<0,001	34,36	<0,001	39,54	<0,001	34,36	<0,001	39,54	<0,001	34,36	<0,001	39,54	<0,001	34,36	<0,001

^aCasos índices foram excluídos das análises

^bHábitos de caça, pesca, dormir próximo à margem do rio ou atividades na mata após as 18 horas.

^cInfecção por *Plasmodium vivax* nos últimos 6 meses.

^dSintomas – febre, cefaleia, artralgia, mialgia e lombalgia – nos últimos 7 dias anteriores à visita.

^eAjuste por tipo de domicílio. ^fAjuste por variáveis do mesmo nível e por tipo de domicílio. ^gAjuste por variáveis do mesmo nível e do modelo 1. ^hAjuste por variáveis do modelo 2, exceto a variável independente Malária pregressa por *P. vivax*.

6.4 GENOTIPAGEM PARASITÁRIA

Para a caracterização de *P. vivax*, utilizamos a tipagem de três marcadores moleculares sendo um o fragmento três da região codificadora da proteína de superfície de merozoíto (*msp1F3*) e dois microssatélites (*MS16* e *Pv3.27*). Os dados da genotipagem molecular foram utilizados afim de explorarmos as conexões epidemiológicas entre as infecções diagnosticadas durante o estudo.

Por meio de amostras coletadas nos mesmos indivíduos em diferentes seguimentos da RCD constatamos uma alta renovação de haplótipos ao longo do tempo, ou seja, uma alta diversidade genética de *P. vivax* na população estudadas. Foram tipadas completamente, ou seja, nos três marcadores utilizados, 343 amostras (95,3%) (123 oriundas dos domicílios índices, 144 entre os vizinhos e 76 amostras de indivíduos controles) com 146 genótipos únicos durante os quatro painéis de RCD. A **figura 70** evidencia o padrão da transmissão de malária no ano de 2013 no município de Acrelândia. Nota-se que o número de amostras genotipadas (representado pela cor cinza) é muito próximo aos casos de *P. vivax* detectados pelo método de RCD realizado pela nossa equipe. Em relação ao total de amostras genotipadas, 85 eram infecções contendo um único clone e, 258 (75,2%) foram consideradas infecções múltiplas.

Figura 70 - Número de amostras de *P. vivax* tipadas em relação ao número de casos sintomáticos diagnosticados pelo Sistema de Vigilância local e os casos diagnosticados pela Busca Ativa Reativa (RCD), Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Foram identificados seis haplótipos mais abundantes (#61, #64, #70, #71, #81 e o #82); eles acometeram cerca de 30,1% do total das infecções e estavam amplamente distribuídos nas localidades de estudo. O genótipo mais comum (#81) foi identificado em 54 amostras de *P. vivax* (15,7%), provenientes das 7 localidades analisadas no estudo; o genótipo #81 foi mais prevalente na localidade PTL, estando presente em 26,1% das infecções analisadas nesta localidade (**Tabela 30**). Apesar disso, não identificamos uma relevante aglomeração temporal dos seis genótipos mais frequentes. O genótipo #81 foi identificado em todo o período de coleta de amostras no estudo (**Figura 71**).

Tabela 30 - Distribuição dos seis genótipos mais comuns de *Plasmodium vivax* (responsáveis por 30,1% do total de infecções locais) segundo as áreas de assentamentos*. Município de Acrelândia, Acre, 2013.

Localidades ^a (número de amostras completamente tipadas)									
Genótipos ^{b,c}	PTL (n=172)	PTD (n=54)	ORI (n=35)	SJB (n=33)	SAP (n=24)	RED (n=21)	PEP (n=4)	Total (n=343)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
61	7 (4,1)	1 (1,9)	2 (5,7)	1 (3,0)	0	0	1 (25,0)	12 (3,5)	
64	7 (4,1)	1 (1,9)	0	2 (6,1)	2 (8,3)	0	0	12 (3,5)	
70	5 (2,9)	0	0	0	0	2 (9,5)	1 (25,0)	8 (2,3)	
71	2 (1,2)	3 (5,5)	2 (5,7)	1 (3,0)	0	0	0	8 (2,3)	
81	45 (26,1)	2 (3,7)	1 (2,9)	3 (9,1)	1 (4,2)	2 (9,5)	0	54 (15,8)	
82	7 (4,1)	0	1 (2,9)	0	0	1 (4,8)	1 (25,0)	10 (2,9)	
Outros	99 (57,5)	47 (87,0)	29 (82,8)	26 (78,8)	21 (87,5)	16 (76,2)	1 (25,0)	239 (69,7)	

^aÁreas de assentamentos: PDS Porto Luiz (PTL), PAE Porto Dias (PTD), PA Orion (ORI), PA São João do Balanço (SJB), PA Santo Antônio Peixoto (SAP), PE Redenção (RED), PAD Pedro Peixoto (PEP).

^bForam considerados somente o genótipo predominante em cada amostra analisada.

^cPorcentagens (%) nas colunas foram calculadas para o número total de amostras analisadas dentro de cada localidade.

Figura 71 - Distribuição temporal de genótipos predominantes para *Plasmodium vivax* em indivíduos participantes do estudo, de acordo com o mês de participação no estudo, Município de Acrelândia, Acre, 2013.

6.4.1 Focos de transmissão

Neste estudo foram examinados os genótipos de *P. vivax* dentro dos 41 potenciais focos de transmissão identificados, cada foco compreendeu um domicílio índice e 5 domicílios vizinhos. Entre 1 e 21 infecções (média de 6,5) infecções por *P. vivax* foram genotipadas completamente por foco durante os quatro seguimentos (n = 267 genótipos analisados).

Em relação à análise do haplótipo majoritário podemos verificar que em 8 focos de transmissão o mesmo genótipo do parasito foi compartilhado tanto no domicílio índice quanto nos domicílios vizinhos (Figuras casos 3 e 30). Identificamos 16 dos 41 focos de transmissão que tiveram o mesmo genótipo parasitário repetido em visitas subsequentes – 30, 60 e 180 dias após a visita inicial. Um total de 19 focos de transmissão possuíam genótipos compartilhados em algum dos seguimentos (exemplos apresentados pelas **Figuras 3, 4, 9 e 30**).

A **Figura 72** evidencia vários exemplos de genótipos compartilhados e exclusivos dentro do foco #3 (localizado na PTL). Nota-se que dois membros do domicílio índice compartilham o mesmo genótipo (#81) no dia 0; um deles (que não foi tratado no dia 0) ainda abrigava este genótipo 30 dias mais tarde, consistente com uma infecção persistente por formas sanguíneas do parasito ou a uma recaída precoce homóloga, mas adquiriu um genótipo diferente (#88) identificado na sua próxima infecção no dia 60. O haplótipo #81 reapareceu em dois membros de domicílios vizinhos que não estavam relacionados nos dias 60 e 180, de acordo com a subsequente transmissão proveniente do domicílio índice. Dois casos de genótipos similares também foram encontrados em comparações dos pares de amostras, incluindo infecções mistas de clones distintos (**Tabela 31**). Finalmente, haplótipos únicos (#3, 10, 77, 82, 88, 120, e 141) foram encontrados em sete amostras dentro do foco de transmissão, de acordo com as infecções por *P. vivax* esporádicos que resultaram em nenhuma amostra parasitária relacionada a transmissão subsequente dentro do aglomerado. Nota-se que nos domicílios não relacionados aos domicílios índices (domicílios controles) diagnosticamos três infecções (todas na visita de 30 dias), todas com haplótipos distintos e que não reapareceram nas visitas subsequentes.

Figura 72 - Genótipos únicos e compartilhados no foco # 3, localizado na Gleba Porto Luiz, Acrelândia, durante os quatro segmentos de Busca Ativa Reativa, 2013.

Outro exemplo de foco de transmissão é evidenciado no caso # 4, onde observa-se genótipos idênticos do parasito dentro do aglomerado (também a partir de PTL), sugerindo uma fonte comum de infecção. Os genótipos #64 (compartilhado por dois membros de diferentes residências vizinhas, no dia 30) e # 4 (que na visita de 180 dias foi compartilhado pelo caso índice e outro membro do domicílio índice, no dia 180). A fonte de infecção não pode ser determinada nestes casos. Curiosamente, o genótipo #81 (que representa mais de um quarto de todos os genótipos da localidade PTL) foi recuperado do caso-índice (no dia 60) e um membro morador de domicílio controle (no dia 30). A probabilidade de encontrar o genótipo # 81 em um par de amostras do parasita escolhidos aleatoriamente a partir de PTL (dada pela frequência desse genótipo na população de parasitos local) é de 6,8% (**Figura 73**).

Figura 73 - Genótipos únicos e compartilhados no caso # 4, localizado na Gleba Porto Luiz, Acrelândia, durante os quatro seguimentos de Busca Ativa Reativa, 2013.

A **Figura 74** evidencia um caso de infecção recorrente com o mesmo genótipo dentro do aglomerado # 9, na localidade Porto Dias. O genótipo # 37 foi recuperado a partir do caso índice e um membro de um domicílio vizinho no dia 0 (consistente com uma fonte comum de infecção; como exemplificado na **Figura 56**). Este mesmo morador do domicílio vizinho, cuja infecção primária foi patente e, portanto, tratada com CQ (3 dias) e PQ (7 dias), apresentou parasitemias recorrente com genótipo # 37 no dia 60 e, infecção subpatente no seguimento de 180 dias, indicando a possibilidade de recaídas com parasitos homólogos ou uma doença crônica, com baixa carga parasitária de estágio sanguíneo de *P. vivax* durante os 180 dias do estudo. Curiosamente, o genótipo #37 foi diagnosticado exclusivamente na localidade PTD.

Figura 74 - Genótipos únicos e compartilhados no caso # 9, localizado na Reserva Porto Dias (próximo à fronteira com a Bolívia), Acrelândia, durante os quatro segmentos de Busca Ativa Reativa, 2013.

No foco # 30, localizado no PTL, o genótipo predominante #81 foi identificado somente em moradores do domicílio índice, no caso índice (visita do dia 0 e no dia 60, este último caso caracterizando uma infecção subpatente), porém não foi diagnosticada infecção nesse caso índice na visita de 180 dias; nesse caso específico a identificação novamente do genótipo #81 nesse mesmo indivíduo pode ser decorrente de uma nova infecção pelo mesmo haplótipo circulante ou a possibilidade de uma recaída da doença. Outro morador do domicílio índice apresentou o genótipo # 81 nas visitas de 60 e 180 dias, haplótipo diferente do diagnosticado na visita de 30 dias (genótipo #56). Este participante do estudo estava no início da gestação na visita de 60 dias (entre o 2º e 3º trimestre). Assim, o esquema terapêutico executado foi do tratamento semanal, por 12 semanas, somente com o uso de CQ (comprimidos de 150 mg), para prevenção de recaídas por *P. vivax*. Entretanto, foi identificado no mesmo indivíduo o mesmo genótipo (#81) na visita de 180 dias, o que pode ser decorrente de recaídas do parasito (**Figura 75**).

Figura 75 - Genótipos únicos e compartilhados no caso # 30, localizado na Gleba Porto Luiz, Acrelândia, durante os quatro segmentos de Busca Ativa Reativa, 2013.

Em nosso estudo, foram analisados todos os casos de infecções recorrentes dentro dos focos de transmissão (**Tabela 31**). Um total de 130 genótipos foram recuperados a partir de 54 indivíduos que tiveram recidivas do parasito (2 a 4 episódios) durante o estudo. Genótipos recuperados da maioria (41 ou 75,9%) infecções recorrentes eram diferentes daqueles encontrados na infecção primária, mesmo considerando alelos minoritários em comparações de pares envolvendo infecções de vários clones, de acordo com infecções esporádicas não relacionados ou recaídas heterólogas. No entanto, 11 (20,4%) indivíduos tiveram um ou mais episódios de parasitemia recorrente com genótipos idênticos ou semelhantes e dois (3,7%) tiveram infecções consecutivas envolvendo genótipos idênticos e diferentes. Em geral, encontramos 17 casos de genótipo recorrente nestes 13 sujeitos, 30-180 dias após a infecção primária, o que pode representar recrudescência do parasito ($\leq$ 30 dias após a infecção primária), as recaídas homólogas após o tratamento bem-sucedido contra parasitos sanguíneos ou infecções em fase crônica de indivíduos não tratados (ver Figura 2 para definições). Cinco indivíduos com genótipos recorrentes apresentaram infecções primárias subpatentes, que foram deixados sem tratamento, consistentes com infecções de longa duração a serem detectadas nas seguintes RCD (Tabela). Apenas seis moradores de domicílios controles apresentaram parasitos recorrentes detectados por qPCR durante o estudo. Em todos os casos, diferentes genótipos foram encontrados na infecção primária e na infecção subsequente. Apesar de todas as infecções terem sido subpatentes e não tratadas, não encontramos exemplo de infecção crônica com o mesmo genótipo reaparecendo em visitas consecutivas para os moradores dos domicílios controles.

Tabela 31 - Genótipos multilocus em infecções consecutivas de *Plasmodium vivax* diagnosticadas em 54 participantes do estudo durante os diferentes seguimentos da RCD, Acrelândia, Acre, 2013.
(continua)

Foco	Indivíduo	Seguimento	Mês	msp1F3				Pv3.27				MS16				Comparação dentro do grupo (interpretação mais plausível)
				A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	
1	1	d0*	Janeiro	205				216		255				255		Genótipos diferentes
		d60*	Abril	190				204	208	276				276	189	
	14	d60*	Abril	190				220		276				276	156	Genótipos diferentes
		d180	Agosto	190				208		276				276		
2	30	d0*	Fevereiro	208				300		300				300	174	Genótipos diferentes
		d180	Agosto	205				208	300	300				300		
3	34	d0*	Fevereiro	235	190			208		276				276		Genótipos diferentes
		d60	Abril	205	151			204	152	126				126		
	36	d0	Fevereiro	205				216		255				255		Genótipos idênticos no d0 e d30 (infecção não tratada persistindo ou provável recaída); diferente no d60.
		d30	Março	205				216		255				255		
4	47	d60*	Abril	205				220		255				255		Genótipos diferentes
		d60	Abril	205	250			216		171	255			171	255	
	52	d180	Agosto	205	151			216		258				258		Genótipos diferentes
		d0*	Fevereiro	205				216		258				258		
	53	d60*	Abril	205				216		255				255		Genótipos diferentes
		d180*	Agosto	106	205			208		255				255		
	435	d60	Abril	205	271			228	216	198	252			198	252	Genótipos diferentes
		d180	Agosto	106	217			208		255				255		
	435	d30	Março	208	205			208	216	300	174			300	174	Genótipos diferentes
		d60	Abril	202				208		189	276			189	276	

Tabela 31 - Genótipos multilocus em infecções consecutivas de *Plasmodium vivax* diagnosticadas em 54 participantes do estudo durante os diferentes segmentos da RCD, Acrelândia, Acre, 2013.
(continua)

Foco	Indivíduo	Seguimento	Mês	<i>m</i> <i>sp</i> 1 <i>F</i> 3				<i>Pv</i> 3.27				<i>MS</i> 16		Comparação dentro do grupo (interpretação mais plausível)
				A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	
9	335	d0*	Fevereiro	202		208		276		Genótipos idênticos (infecção tratada persistindo ou recaídas)				189
		d60*	Maio	202		208		276						
		d180	Agosto	202		208		276						
10	334	d60*	Maio	205	226	256	216	255		Genótipos diferentes				258
		d180*	Setembro	205	250	208		258						
		d0*	Março	205	226	216		255		Genótipos diferentes				228
12	280	d30*	Abril	205		252		228						
		d0*	Março	205	229	216		255		Genótipos idênticos (recaída tardia)				195
		d180	Setembro	205		228	216	255	216					
14	453	d30	Abril	205	226	216		255		Genótipos idênticos no d30 e d180 (persistência da infecção não tratada ou recaída tardia), porém distinta no d60.				276
		d60	Maio	205		220		255						
		d180	Setembro	205		204		255		Genótipos distintos.				255
15	323	d60*	Junho	202	199	208		276						
		d180*	Setembro	202		208	216	255		Genótipos distintos.				273
		d30*	Abril	202	205	204		276						
	328	d60*	Maio	208	205	208	216	276	126	Genótipos distintos.				207
		d180	Setembro	217		248		303	207					
330		d30*	Abril	205		280	204	174		Genótipos distintos.				189
		d60*	Maio	202		208		255						
		d30*	Abril	205		220		255		Genótipos distintos.				207
	331	d60*	Maio	202	247	220		255						
		d180*	Setembro	220		252		207		Genótipos distintos.				126
18	88	d0*	Abril	205	211	208	216	126	111	Genótipos distintos.				156
		d60*	Junho	211	208	216		156						

Tabela 31 - Genótipos multilocus em infecções consecutivas de *Plasmodium vivax* diagnosticadas em 54 participantes do estudo durante os diferentes seguimentos da RCD, Acrelândia, Acre, 2013.
(continua)

Foco	Indivíduo	Seguimento	Mês	msp1F3		Pv3.27		MS16		Comparação dentro do grupo (interpretação mais plausível)
				A1	A2	A1	A2	A1	A2	
19	547	d0*	Abril	205		216		255		Genótipos distintos.
		d30*	Maio	205		320	232	255		
	565	d0*	Abril	205		216		255		Genótipos distintos.
		d30*	Maio	109	130	208	216	129		
21		d60*	Junho	211		204	252	123		Genótipos distintos.
		d180*	Outubro	205	151	200		300		
	625	d0*	Abril	202		208		303		Genótipos distintos.
		d30*	Maio	217		276		174		
23	737	d0	Maio	205		216		255		Genótipos idênticos (persistência da infecção não tratada ou recaída tardia)
		d180	Novembro	205		216	208	255		
	748	d0	Maio	205	202	216		255		Genótipos distintos.
		d180	Novembro	205	151	208	212	204		
24	800	d0*	Maio	205	226	216		255		Genótipos distintos.
		d180	Novembro	205		216		258		
	841	d0	Maio	202		208		243		Diferentes genótipos.
		d30	Junho	202		212		276		
27	857	d0	Maio	205		216		255	183	Genótipos idênticos (persistência da infecção não tratada ou possível recaída)
		d60*	Junho	205		216	228	255	198	
	1393	d30	Junho	106	124	208		255		Genótipos distintos.
		d180*	Novembro	205		228	216	126		
28	1398	d30	Junho	205	151	204	252	126		Genótipos distintos.
		d60	Julho	205		216		255		
	93	d0*	Maio	205		220		255	183	Genótipos distintos.
		d60	Junho	205		216		255		

Tabela 31 - Genótipos multilocus em infecções consecutivas de Plasmodium vivax diagnosticadas em 54 participantes do estudo durante os diferentes seguimentos da RCD, Acrelândia, Acre, 2013.
(continua)

Foco	Indivíduo	Seguimento	Mês	msp1F3		Pv3.27		MS16		Comparação dentro do grupo (interpretação mais plausível)
				A1	A2	A1	A2	A1	A2	
30	868	d0*	Maio	205		216		255		Genótipos idênticos (possível recalda)
		d60	Agosto	205		216	208	255	123	
		d30*	Julho	205		204	216	255		
		d60*	Agosto	205	202	216		255		
		d180*	Dezembro	205		216		255		
31	921	d0	Maio	217		216		174		Genótipos idênticos (recrudescência ou recalda tardia). a Gestante – tratamento exclusivo com cloroquina, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde.
	1539	d180	Dezembro	106		208	192	204		
		d30	Julho	205		252		276		
		d60	Agosto	205	190	204		123		
		d0*	Maio	217		228		264	156	
		d30*	Julho	106	124	208		129		
34	881	d30*	Julho	226	205	204	226	303		Genótipos diferentes.
		d60*	Agosto	202	256	208		207		
		d60*	Agosto	202		208		207	201	
		d180	Dezembro	202		208		303		
		d0*	Junho	205		216	204	255	216	
35	1025	d60*	Agosto	199		228		255		Genótipos diferentes.
		d0	Junho	202		208		303		
		d30	Julho	205		216		276		
36	1098	d0*	Junho	205		216	204	255		Genótipos diferentes.
		d30	Julho	190	211	208		276		
38	1261	d0*	Julho	235	190	208	188	276		Genótipos diferentes.
		d30*	Agosto	205	202	208	216	276		

Tabela 31 - Genótipos multilocus em infecções consecutivas de *Plasmodium vivax* diagnosticadas em 54 participantes do estudo durante os diferentes seguimentos da RCD, Acrelândia, Acre, 2013.
(conclusão)

Foco	Indivíduo	Seguimento	Mês	<i>msp1F3</i>		<i>Pv3.27</i>		<i>MS16</i>		Comparação dentro do grupo (interpretação mais plausível)
				A1	A2	A1	A2	A1	A2	
39	1309	d0*	Julho	208	229	228	208	177	183	Genótipos diferentes.
		d30	Agosto	205		208		174		
40	1350	d0*	Julho	205		216		255	183	Genótipos idênticos (possível recaída)
		d60	Setembro	205		216		255	213	
41	1561	d0*	Julho	202		208	204	273	228	Genótipos idênticos (recrudescência ou recaída primária)
		d30*	Agosto	202	226	204	226	273	228	

A1 e A2 correspondem, respectivamente, ao tamanho (em pb) do alelo majoritário e minoritário (se houver) em um determinado locus. Alelos idênticos (seja pelo majoritário ou minoritário) em amostras consecutivas dos mesmos pacientes são destacadas (cor amarelo). Definição de um par de genótipos diferentes, significa dizer que não houve compartilhamento do alelo, considerando tanto A1 e A2.

*Infecções tratadas com cloroquina e primaquina de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde.

7 DISCUSSÃO

Apesar dos ganhos consideráveis principalmente em relação a diminuição na mortalidade e morbidade decorrentes da malária, a descontinuidade dos programas, geralmente de característica vertical (“Campanhas”), além dos resultados alcançados não atenderem as expectativas esperadas culminaram, desde o início dos anos de 1980 até a primeira década dos anos 2000, em um certo pessimismo em relação aos objetivos de eliminação e erradicação da malária. Porém, desde o ano 2007, em consequência da drástica redução mundial no número de casos, aliado aos avanços científicos e incentivo aos programas regionais, houve uma mudança nesse cenário, sendo a eliminação (e posteriormente a erradicação) da malária um objetivo compartilhado por diversos países no mundo. Para alcançar a eliminação e impedir o ressurgimento da malária, os sistemas de vigilância devem ser capazes de interromper com eficácia a transmissão através da detecção de todas as infecções de malária possíveis na área em um tempo hábil (Liu et al., 2013). Em áreas de baixa endemicidade, a abordagem mais adotada de vigilância é a estratégia de detecção ativa de casos, em indivíduos de alto risco em uma comunidade (“hotspots”), ou em moradores do mesmo domicílio e vizinhos de um caso detectado passivamente (“hotspots”), são monitorados afim de se identificar a infecção e trata-los como medidas de resposta rápida, incluindo o controle de vetores locais (Sturrock et al., 2013). A RCD pode ser uma estratégia adicional para se identificar potenciais reservatórios de malária em áreas de baixa transmissão (geralmente composto por portadores assintomáticos da infecção) podendo atuar em conjunto com a vigilância passiva nessas localidades (Stresman et al., 2010; van Eijk et al., 2016).

O Brasil reduziu a malária em seu território em mais de 70% no número de casos durante as últimas três décadas. Assim, em consonância com a atual Agenda de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas, que pretende alcançar a meta global de redução de 90% no número de casos de malária até o ano de 2030 e, consequentemente eliminar a malária em 35 países (WHO, 2015a), o Brasil lançou, por meio do Ministério da Saúde, em novembro de 2015 o Plano para a Eliminação da Malária no país (Ferreira, Castro, 2016). Alterações na epidemiologia clínica da malária, como a alta prevalência de portadores assintomáticos do parasito, mudanças na distribuição espacial da doença que passa a ser heterogênea, mais local e focal, além de uma transmissão maior em populações e locais de difícil acesso, enfatizam a

necessidade do planejamento de estratégias operacionalmente viáveis que possam identificar reservatórios de parasitas em áreas de transmissão residual de malária.

O *Plasmodium vivax* é a espécie mais comum implicada na transmissão da malária na região Amazônica (70 – 90% dos casos), sendo responsável por > 80% dos casos de malária no Brasil (PAHO, 2014; WHO, 2015b); entretanto, o controle e a eliminação da malária vivax é um processo complexo que envolve dentre outros fatores, questões biológicas do parasito (baixas parasitemias, rápida produção de formas sexuadas e formas latentes) (WHO, 2015d). Apesar de a RCD ter sido implementada por diferentes programas de combate à malária (Kunene et al., 2011; Tatarsky et al., 2011; Abeyasinghe et al., 2012; Herdiana et al., 2016), existem diversos desafios como detecção das infecções duplamente invisíveis ao sistema de vigilância (infecções subpatentes e as assintomáticas), além de uma escassez na literatura de estudos científicos acerca da eficácia das estratégias de combate à malária, especialmente em áreas de baixa transmissão, candidatas a eliminação da doença. Portanto, neste estudo, avaliou-se uma estratégia RCD adaptada para comunidades amazônicas rurais com baixa endemicidade *P. vivax* e transmissão focal de episódios de malária.

Nossos resultados reforçam as evidências de que as infecções por *P. vivax* são altamente focais (aglomerados) nos domicílios na Amazônia rural (Castro et al., 2007; da Silva-Nunes et al., 2008). Tal evidência indica que programas de monitoramento baseado na RCD de domicílios índices pode ser efetivo na detecção de uma grande proporção de portadores do parasito, muitos desses assintomáticos, em domicílios de alto risco. Além disso, moradores de domicílios índices apresentaram chance aumentada de infecção não somente na visita inicial, mas também nos seguimentos subsequentes de RCD e até 180 dias após a identificação do caso índice, o que sugere que mais de uma abordagem por meio RCD pode ser necessário para se detectar novas infecções dentro desses aglomerados. Todavia, apesar do qPCR ter detectado quase o dobro do número de infecções por microscopia nos moradores do domicílio índice, infecções subpatentes contribuíram com somente com 7,6% do total da biomassa parasitária circulante entre moradores dos domicílios índices. De forma conjunta, esses dados sugerem que a alta sensibilidade do método molecular não é um componente essencial nos programas de vigilância por RCD para os membros dos domicílios índices.

Os programas que adotam a RCD em larga escala podem ser limitados para monitorar moradores do domicílio índice ou se entender para outros domicílios na vizinhança do caso índice (Smith Gueye et al., 2013; van Eijk et al., 2016). Presume-se que um fator limitante da RCD para domicílios índices é seu custo-efetividade em áreas onde a vigilância rotineira de malária consegue detectar uma grande proporção de domicílios com casos positivos; no entanto, o monitoramento ativo em torno desses domicílios para se detectar novas infecções pode ser necessário em áreas com baixa cobertura da vigilância passiva (Searle et al., 2013). As comparações entre os dados disponíveis na literatura são limitadas devido a utilização de diferentes critérios para se definir e recrutar "vizinhos" (por exemplo, o raio pré-definido em torno de casos índice *versus* número predefinido de domicílios mais próximos; todos os vizinhos *versus* somente vizinhos que apresentam febre) e por diferentes características biológicas (por exemplo, distância do voo) de mosquitos vetores locais (Pampana, 1963; Smith Gueye et al., 2013).

Em nosso estudo evidenciamos que as taxas de positividade de malária entre os membros dos domicílios vizinhos no dia 0, ou seja, quando o diagnóstico do caso índice desencadeou a investigação inicial, não foram significativamente diferentes daquelas verificadas em habitantes selecionados aleatoriamente nas mesmas comunidades (domicílios controles). Sendo assim, o monitoramento de moradores de domicílios vizinhos no mesmo momento do diagnóstico do caso índice não parece ter um melhor custo-benefício do que a triagem de indivíduos escolhidos aleatoriamente para a identificação de novas infecções por *P. vivax* em nossa área de estudo. No entanto, altas taxas de positividade por microscopia foram detectadas em moradores de domicílios vizinhos, em relação aos domicílios controles, ao longo dos meses do estudo, com uma tendência semelhante observado para o diagnóstico baseado em qPCR nos dois últimos seguimentos de RCD. Além disso, quase dois terços da biomassa de *P. vivax* identificada entre os participantes foi encontrada em moradores de domicílios vizinhos, destacando sua potencial contribuição para a transmissão contínua da malária na comunidade. Assim, concluímos que os domicílios vizinhos devem ser alvos de busca em programas de RCD em áreas endêmicas semelhantes ao nosso local de estudo.

Uma das principais limitações das estratégias baseadas na RCD é que os portadores assintomáticos do plasmódio não são identificados na ausência de infecção sintomática diagnosticada em sua vizinhança. A presença de malária assintomática pode estar diretamente relacionada a velocidade à qual a transmissão da malária diminui, assim, quando a diminuição da transmissão é mais rápida do que a perda de imunidade numa população, o reservatório de portadores assintomáticos do parasito pode ser significativo para a manutenção da transmissão local (WHO, 2012a). Recentemente na região costeira do Quênia, pesquisadores revelaram dados que evidenciam diferentes características de focos de infecções assintomáticas comparadas as sintomáticas, com uma maior estabilidade temporal da primeira em indivíduos > 10 anos; estes aglomerados com infecções puramente assintomáticas ou algumas sintomáticas não necessariamente coincidem espacialmente em todas as localidades (Bejon et al., 2010). Diante da resposta imune do hospedeiro adicionado aos antimaláricos de uso rotineiro, ambos reduzindo a morbidade e mortalidade da doença, a preocupação atual na persistência da parasitemia em indivíduos não detectados pelo sistema de vigilância de rotina não está somente na geração de sintomas, mas também na produção de gametócitos implicados na manutenção da transmissão (Imwong et al., 2016). Assim como o Brasil, a Guatemala encontra-se na fase de controle da doença, entretanto este país faz parte da iniciativa de eliminação da doença na região da Mesoamerica e das Ilhas Espanholas (EMMIE). Em um estudo transversal realizado no país foi implementada a estratégia de RCD em seis comunidades sentinelas onde se detectou exclusivamente infecções por *P. vivax* nas áreas de estudo. Os autores verificaram que ¼ dos indivíduos positivos para malária apresentavam gametócitos e 86,7% eram portadores assintomáticos e a infecções submicroscópicas, além de 22,2% dos participantes terem sido diagnosticados em mais de um seguimento com malária vivax o que poderia ser em decorrência da reativação de hipnozoítos do parasito (Lennon et al., 2016). Em uma série de estudos transversais realizados entre os anos de 2011 a 2014 em áreas rurais de baixa a moderada transmissão de malária na Colômbia, onde o *P. vivax* foi responsável pela maioria dos casos da doença em duas das três áreas analisadas no estudo, verificou-se que 97% das infecções detectadas por qPCR eram submicroscópicas e 90% dos infectados não apresentarem sintomas clínicos (Vásquez-Jiménez et al., 2016). Altas taxas de prevalência de infecções assintomáticas e subpatentes para *P. vivax* foram

reportadas em diversos estudos na região da Amazônica do Brasil (Alves et al., 2005; Coura et al., 2006; da Silva-Nunes et al., 2008; Barbosa et al., 2015), do Peru (Roshanravan et al., 2003; Rosas-Aguirre et al., 2015) e da Venezuela (Laserson et al., 1999). As infecções assintomáticas detectadas em nossos indivíduos controles (que não faziam parte da estratégia de RCD), contribuíram com uma pequena fração (4,1%) da carga parasitária total diagnosticada. Sua parcela de contribuição para a infecciosidade de mosquitos vetores locais permanece desconhecida. Um estudo descreveu uma taxa de infecção de 1,2% após a alimentação do *An. darlingi* com sangue coletado de portadores assintomáticos de *P. vivax* em comparação com 22% de infectividade para os mosquitos alimentados com sangue de portadores sintomáticos (Alves et al., 2005), assim como verificado no continente africano (Beavogui et al., 2010; Kone et al., 2010); em contrapartida, apesar do pequeno número de amostras analisadas, na Colômbia testou-se a infectividade de indivíduos assintomáticos e submicroscópicos portadores de *P. vivax*, com uma alta taxa, 57% (8/14), infectando mosquitos da espécie *Anopheles albimanus* (Vallejo et al., 2016). Sob a hipótese de que o número de formas assexuada circulantes de *P. vivax* e gametócitos maduros estão positivamente correlacionadas entre si (Mckenzie et al., 2006), espera-se que indivíduos assintomáticos portadores de baixa carga parasitária contribuam relativamente pouco para a transmissão vigente de malária em um determinado momento. Entretanto esses indivíduos podem representar um grande número de fontes de infecção diária se a parasitemia permanecer durante semanas ou meses e a gametocitemia atingir um limiar de densidade crítica (ainda não determinado) para que a infecção pelo mosquito seja bem sucedida (Bousema, Drakeley, 2011; Vallejo et al., 2016). De forma positiva, em nossa população de estudo verificamos raras infecções assintomáticas que persistiram nas visitas subsequentes entre os membros dos domicílios controles, além do que nenhuma delas apresentaram o mesmo genótipo, o que sugere que a maioria dos episódios de infecções assintomáticas foram de curta duração. O monitoramento periódico de exame de sangue em massa por meio de métodos de diagnósticos de alta sensibilidade pode apresentar uma boa relação entre o custo e a efetividade para abordar este reservatório oculto do parasito nos programas de eliminação de malária.

O principal objetivo da RCD é a interrupção da transmissão focal da malária, por meio da identificação de todos os portadores do plasmódio (sintomáticos ou não), objetivando-se a eliminação da doença. Entretanto a utilização dessa estratégia ainda

é um debate vigente (van Eijk et al., 2016). No Sri Lanka, país que recebeu recentemente o certificado de área livre de malária, a estratégia de RCD contribuiu de forma significativa na redução da magnitude dos picos de transmissão sazonal pela identificação de portadores sintomáticos ou não do parasito, apesar da baixa cobertura populacional ter sido relatada (Abeyasinghe et al., 2012). Em contrapartida, concluiu-se que a RCD não foi uma estratégia eficaz na detecção de novos casos de malária em duas cidades da Índia (van Eijk et al., 2016). A escala utilizada para uma estratégia de RCD – em relação ao raio de análise e a cobertura populacional - é fundamental para que o sistema de vigilância possa vir a obter êxito com a estratégia. Em um estudo transversal em cinco áreas de baixa transmissão de malária na Ilha de Sumatra, Indonésia, foi realizada a estratégia de RCD, onde os autores verificaram que indivíduos oriundos de residências dentro do raio de 100 m de distância do caso índice (microscopia positiva detectados por meio da vigilância passiva) estavam associados de forma positiva à infecção pelo plasmódio (Herdiana et al., 2016). Os autores salientam a necessidade de se otimizar a RCD em áreas de baixa transmissão de malária, inclusive em relação a distância pré-definida de abrangência da estratégia naquele país em torno dos casos índices (500 m). Em países no continente africano, estudos sugerem adaptações em relações as estratégias voltadas a eliminação da malária em diferentes países, como na Suazilândia, onde verificou-se que o raio de 1 km de distância utilizado na busca ativa de casos de malária constitui um grande desafio na logística do sistema de vigilância aparentando ser insustentável naquela localidade (Sturrock et al., 2013b). O Programa Nacional de Controle da Malária em Zâmbia (em uma província de baixa transmissão) implementou a estratégia de RCD com base no raio de 140 m de distância de um caso índice identificado com malária pelo RDT. Do total de domicílios monitorados, apenas 32% estavam inseridos no critério pré-definido da RCD (140 m); assim, os autores concluíram que onde são limitados os recursos, a cobertura e o método de diagnóstico, a RCD pode não ser suficiente para a eliminação da malária nessas áreas de baixa transmissão, sendo necessário a introdução de estratégias alternativas visando a interrupção da transmissão da doença (Searle et al., 2016). Em Zanzibar, o programa local utilizou-se da RCD na detecção de casos de malária para cada mil habitantes; notou-se a necessidade da realização da busca ativa em aproximadamente 100 domicílios vizinhos acerca do caso índice para se prevenir a reemergência da malária na região

(ZMCP⁶, 2009 apud Littrell et al, 2013). No Quênia, os pesquisadores verificaram que as diferentes abordagens utilizadas (detecção passiva e detecção ativa) revelaram diferentes características das infecções de malária em dois anos de estudo, sendo a ACD uma ferramenta essencial para o monitoramento e o controle da malária no país (Zhou et al., 2015).

Em consonância com a orientação estratégica de realização de busca ativa recomendada pela OMS (1 – 2 km de distância do caso índice, baseado no raio de voo do *Anopheles*) (WHO, 2012b), o PNCM orienta que a ACD no Brasil seja realizada em um rio de 1 km de distância do caso índice. Em nosso estudo, uma área de baixa transmissão de malária e que possui dificuldades de acesso as populações em diferentes localidades rurais, verificamos a dificuldade de se identificar domicílios no raio pré-definido pelo programa de malária no país. Ao testarmos nossa estratégia em uma área rural da Amazônia que se aproxima da eliminação da doença, verificamos que em algumas situações a distância de cobertura da RCD (1 km) em relação ao domicílio índice deve ser estendida para uma melhor cobertura populacional pela RCD. A frequência da RCD na detecção de novos casos a partir da identificação do caso índice é importante como verificado em um estudo na Suazilândia (Sturrock et al., 2013b). Torna-se importante a detecção rápida de casos colaterais (ou secundários) aos casos índices, já que gametócitos de *P. vivax* geralmente surgem na corrente sanguínea quase ao mesmo tempo do que as formas assexuadas do parasito tornando o indivíduo uma potencial fonte de transmissão para o mosquito vetor antes do diagnóstico das formas sanguíneas do parasito (Bousema, Drakeley, 2011). As recaídas de malária vivax ocasionadas por formas latentes do parasito podem ocorrer semanas, meses ou no período de anos após a infecção primária, mesmo após o tratamento com a primaquina. No Brasil, há relatos de recaídas de *P. vivax* em um período de até seis meses após o primeiro diagnóstico (Boulos et al., 1991).

A RCD pode demandar um esforço logístico grande dos órgãos de vigilância, além de seu alto custo; em adição, os métodos convencionais de diagnóstico (microscopia e o RDT), podem não detectar infecções com baixas cargas parasitárias que são potencialmente viáveis para manter a transmissão do parasito (Okell et al., 2012; Lek et al., 2016). Em uma recente publicação acerca revisão de dados da

⁶ ZMCP: Malaria elimination in Zanzibar: A feasibility assesment. Zanzibar: ZMCP; 2009.

prevalência de malária no Camboja, a fim de comparar os resultados de microscopia em relação ao PCR; de forma similar aos nossos achados, verificou-se que o método molecular detecta aproximadamente o dobro de infecções por *P. vivax* em comparação à microscopia convencional. Os autores ainda sugerem que a estratégia de RCD baseada somente na microscopia pode deixar de identificar uma grande proporção de reservatórios da infecção, especialmente em áreas de baixa transmissão (Lek et al., 2016). Em uma recente publicação referente a três análises transversais para se identificar malária na Tailândia, Baum e colaboradores (2016) relataram que o qPCR identificou 14 vezes mais infecções pelo plasmódio quando comparado à microscopia convencional e que, cerca de 90% das infecções diagnósticas pelo método molecular foram subpatentes e provenientes de indivíduos assintomáticos. Apesar de, até o presente momento, todos os países que alcançaram a eliminação da malária em seus respectivos territórios, independentemente da estratégia de vigilância utilizada, terem utilizando-se da microscopia (ou RDTs) como padrão-ouro de detecção do parasito (obviamente em razão de uma menor disponibilidade de técnicas mais sensíveis na época), relatos de detecção de altas taxas de infecções subpatentes e assintomáticas por *P. vivax* por técnicas alternativas, especialmente em áreas de baixa transmissão (Barbosa et al., 2015; Lek et al., 2016; Motshoge et al., 2016), sugerem que métodos de diagnóstico mais sensíveis devem ser utilizadas nessas áreas afim de um melhor identificação e tratamento dos indivíduos infectados contribuindo assim com a interrupção da transmissão local. No Brasil, a imensa maioria do teste diagnóstico empregado na identificação do plasmódio é por microscopia. Trata-se de uma ferramenta de baixo custo, entretanto sua sensibilidade e especificidade está diretamente relacionado a qualidade na confecção da lâmina e a experiência dos microscopistas (Mbakilwa et al., 2012; Suarez-Mutis et al., 2007). Em uma revisão sistemática sobre infecções subpatentes de malária vivax, verificou-se que sensibilidade do método de gota espessa variou amplamente (4,2 a 94%) nos diferentes estudos analisados. Particularidades na biologia do *P. vivax*, como a baixa carga parasitária no sangue do paciente, aliado ao pouco treinamento de microscopistas colaboram com a diminuição da sensibilidade do método na detecção dessa espécie, podendo se ter um déficit de até 67% na identificação do parasito quando comparado ao diagnóstico por PCR (Moreira et al., 2015). Desde o ano de 2000, o Brasil adotou em todo seu território um modelo assistencial de descentralização da saúde, ou seja, uma maior autonomia de

estados e municípios no gerenciamento e na prestação dos serviços de saúde para a população local. Em sua grande maioria, municípios da região amazônica brasileira possuem limitados recursos financeiros, além de gestões locais pouco eficientes o que muitas vezes reflete em um número reduzido de recursos humanos e técnico no suporte aos programas de endemias, incluindo a malária. Apesar da diferença de renda influenciar a saúde pela escassez de recursos do indivíduo, no município de Acrelândia, a saúde é influenciada diretamente pela escassez de investimentos em infraestrutura (educação, saneamento básico, estradas, serviços de saúde) e de prestação de serviço (número reduzido de agentes comunitários, agentes de endemias e de microscopistas), decorrentes de processos econômicos e decisões políticas local. Apesar de possuir uma sensibilidade relativamente maior do que a microscopia convencional, os métodos moleculares ainda possuem alto custo e necessitam de um maior aparato estrutural para sua realização. Essa demanda é inviável para muitos municípios (e estados) que são responsáveis pelos programas de combate à malária, principalmente devido à falta de recursos financeiros, mão de obra especializada e dificuldades logísticas no emprego de métodos de diagnósticos mais sofisticados. Investimentos na capacitação de agentes de endemias e microscopistas, afim de melhorar a qualidade na confecção e na leitura de lâminas, certamente contribuirá de forma positiva com melhorias na sensibilidade e especificidade do método convencional. Entretanto, métodos alternativos de diagnóstico que tenham uma boa sensibilidade e um baixo custo, como o LAMP (Pöchl et al., 2010; Cook et al., 2015) e o CLIP-PCR (do inglês, *capture and ligation probe-polymerase chain reaction*) surgem como alternativas úteis, na estratégia de RCD, para a identificação de focos de transmissão (especialmente portadores assintomáticos) em áreas de transmissão residual de malária (Cheng et al., 2015). Os inquéritos sorológicos nessas áreas pode auxiliar a vigilância de rotina como uma “proxy” para se identificar grupos prioritários na transmissão local da malária, além de auxiliar na análise do diagnóstico empregado na rotina da vigilância, como relatado na Somália (Bousema et al., 2008), Tailândia (Baum et al., 2016) e em uma área de transmissão heterogênea na região amazônica peruana (Rosas-Aguirre et al., 2015). Uma estratégia alternativa a RCD para áreas de baixa cobertura é o tratamento focal em massa de grupos de indivíduos afim de interromper o ciclo de transmissão da malária. No Brasil (e na maioria dos países da América Latina), devido a maior prevalência do *P. vivax* como espécie causadora da malária, existem obstáculos para

o tratamento focal em massa. Entre estes, o período de tratamento de 7 dias com o hipnozoítico de uso rotineiro, primaquina, podendo ocasionar abandono do tratamento, especialmente indivíduos sem sintomatologia clínica, além de ainda não haver disponível um teste de uso em larga escala para análise da dG6PD. A droga antimalárica tafenoquina surge como candidata a substituição da PQ para ação contra as formas latentes do *P. vivax* por ter um tempo maior de meia-vida (podendo ser administrada em dose única), todavia a tafenoquina possui os mesmos efeitos colaterais da primaquina, especialmente podendo causar grave hemólise em indivíduos com dG6PD. Análises bayesianas podem ser úteis para se estimar a prevalência de malária em uma região onde não há um diagnóstico padrão ou quando este teste de diagnóstico padrão for imperfeito em relação a sua especificidade e sensibilidade (Lu et al., 2010).

A análise multinível dos fatores associados à infecção pelo *P. vivax* se faz útil à medida que controla os fatores individuais como idade, sexo, tempo de ocupação na área, ou seja, não basta apenas analisar os determinantes individuais de saúde mas também conhecer os determinantes de saúde ao nível de grupos populacionais. Enquanto que as análises de fatores individuais são importantes para identificar que indivíduos no interior de grupos estão submetidos a uma maior chance de se infectar pelo plasmódio, as diferenças nos níveis entre grupos populacionais estão mais relacionadas com outros fatores, como a localidade de moradia, por exemplo. Portanto, os chamados “enfoques multiníveis” buscam analisar de forma integrada as abordagens individuais e de grupos, biológicas e sociais numa perspectiva dinâmica, ecológica e histórica (Buss e Pellegrini Filho, 2007). O curso histórico de Acrelândia faz com que esse município se enquadre na definição de “malária de fronteira” proposta por Castro e colaboradores (2006). Na criação do município, início da década de 1980, assentamentos agrícolas locais caracterizavam-se como áreas de alto influxo de migrantes de outras regiões do país (em sua grande maioria pessoas sem contato prévio com o plasmódio) e de grandes alterações ambientais (desmatamento) fazendo dessa região uma das localidades com os maiores índices anuais de casos de malária no país naquele período (Marques et al., 1987). Com o passar dos anos, essas áreas receptivas para a doença foram se estabilizando, com a diminuição do desmatamento, maior estabilidade das atividades agrícolas, desenvolvimento urbano além de melhorias na habitação e nos serviços de saúde, o que gerou uma grande redução dos casos da doença no município. Nos dias atuais, em decorrência do

grande empenho no controle da malária na região, o município é caracterizado por uma área estável em relação a transmissão e notifica anualmente menos de 100 casos confirmados de malária. Entretanto, o município abrange dois conceitos importantes para a compreensão da dinâmica na transmissão da malária. Acrelândia (e áreas vizinhas) é receptivo à infecção pelo plasmódio, já que reúne características ambientais favoráveis para a proliferação do mosquito vetor, além de atividades econômicas que de certa forma expõe o indivíduo a transmissão da doença. Além disso, trata-se de uma área vulnerável a entrada do parasito (em especial do *P. falciparum*), pois localiza-se em uma região de fronteira (estadual e internacional), além de o município ter sido palco de frequentes disputas por terras em áreas rurais, ocasionando o influxo (desordenado) de migrantes de outras regiões. Em nossa análise ajustada não verificamos associação entre o sexo, idade e variáveis de exposição com a infecção por *P. vivax* diagnosticada por meio da RCD. De forma contrária, diferentes estudos em áreas de baixa transmissão reportaram associação com o risco aumentado para malária com indivíduos do sexo masculino, como no Senegal (Littrell et al., 2013), Suazilândia (Sturrock et al., 2013b), Indonésia (Herdiana et al., 2016) e na Amazônia brasileira (Monteiro et al., 2015). Em um estudo transversal de PACD realizado no ano de 2012 em 14 distritos de Botsuana (um dos oitos países do sul do continente africano candidato à eliminação da malária até 2018), verificou-se um decréscimo de 7% na infecção por *P. vivax* para um incremento em anos na idade dos participantes (Motshoge et al., 2016), como observado na Etiópia (Golassa et al., 2015), na Amazônia peruana (Delgado-Ratto et al., 2014) e no Camboja (Lek et al., 2016). A aquisição da imunidade após frequente exposição ao parasito da malária (por fatores ocupacionais e de comportamento dos indivíduos) está diretamente relacionada a variação na distribuição da malária em diferentes faixas etárias em áreas de alta e baixa transmissão (Snow, Marsh, 1998). Em um estudo por meio da RCD em áreas de baixa transmissão da malária, na Indonésia, verificou-se associação positiva entre a infecção diagnosticada por microscopia com indivíduos > 15 anos de idade, do sexo masculino e que desempenhavam suas atividades na floresta no período noturno (Herdiana et al., 2016). Por meio de uma análise descritiva, em um município do estado do Pará, apesar de não ter sido verificado associação entre os casos de malária e os indicadores sanitários e socioeconômicos da população analisada, os resultados evidenciam que o número de casos de malária no município, no ano de 2013, foi maior entre indivíduos do sexo

masculino e com idade ≥ 40 anos de idade. A transmissão da malária em área da Amazônia Legal pode estar relacionada ao estilo de vida dos ocupantes dessa área, especialmente migrantes de áreas não endêmicas que ocupam áreas rurais, como assentamentos agrícolas, além de áreas de garimpo (Castro et al., 2006). De fato, indivíduos do sexo masculino e adultos estão mais sujeitos à infecção pela malária nessa região por desempenharem atividades comportamentais e laborais (como extrativismo, desmatamento, caça e pesca) próximo ou no interior da floresta, além da proximidade com os criadouros do mosquito vetor, o que os expõe ao maior risco de transmissão (Tada et al., 2007). Provavelmente, os moradores das áreas estudadas de Acrelândia possuem padrões homogêneos de exposição à malária, ou seja, certos hábitos que poderiam expor o indivíduo à maior probabilidade de se infectar pelo *P. vivax*. O fato de nossos achados apontarem uma maior probabilidade de infecção entre os moradores dos domicílios índices e entre seus vizinhos pode indicar que esses indivíduos possuam hábitos de exposição similares. Acrelândia é um município que possui em sua área rural as atividades de cultura de banana e café, além da pecuária extensiva, como as maiores fontes de renda dos indivíduos. Exceto pelo assentamento PTL, as demais localidades analisadas no estudo são áreas estáveis em relação às mudanças ambientais e as atividades ocupacionais dos moradores o que certamente possui um impacto positivo na redução do número de casos da doença nessas localidades (da Silva et al., 2010; da Silva-Nunes et al., 2012). Esses dados podem sugerir que há uma maior transmissão do *P. vivax* pelo mosquito vetor na região peridomiciliar ou no interior do domicílio, já que as medidas de combate ao mosquito, tanto coletiva (borrifação intradomiciliar) com as individuais (uso de MILDs) foram praticamente abandonadas no município desde o ano de 2010. Diferentemente de nosso estudo, em estudo transversal na Amazônia peruana verificou-se que a idade foi associada de maneira positiva com a infecção por *P. vivax* (Rosas-Aguirre et al., 2015). Em áreas de baixa transmissão da doença uma das evidentes características de alterações na epidemiologia da doença é que a infecção pelo parasito está distribuída de uma forma mais homogênea nas diferentes faixas etárias, diferentemente do que ocorre em áreas hiperendêmicas, como em regiões da África sub-Saariana onde a malária clínica (imensa maioria por *P. falciparum*) é mais incidente em crianças menores de 5 anos de idade, devido ao grau de imunidade, ocasionando um alto índice de mortalidade pela doença nessa faixa etária.

Independentemente da sintomatologia clínica e do tipo de domicílio, o histórico recente de malária vivax entre os participantes pode ser útil como uma ferramenta para se monitorar indivíduos e grupos populacionais prioritários para intervenções contra a malária. O direcionamento das buscas por reservatórios de infecção por meio do monitoramento desses indivíduos justifica-se pelo fato desses sujeitos estarem propenso a uma maior exposição ao parasito, tanto por fatores ambientais, pois, exceto os casos importados, residem em locais onde há transmissão vigente do patógeno, além de estarem sujeitos a recaídas ocasionadas por hipnozoítos de *P. vivax*. Em diferentes estudos em áreas receptivas para malária, os pesquisadores encontraram associação positiva entre infecção diagnosticada para malária e o indivíduo apresentar histórico de infecção pelo parasito (Hustedt et al., 2016; van Eijk et al., 2016).

Apesar das limitações da vigilância sindrômica (D'Acremont et al., 2014), a identificação ativa ou passiva de portadores sintomáticos da infecção é um eficiente método para se identificar indivíduos ou grupos prioritários para a intervenção (Hustedt et al. 2016; Tarimo et al., 2015). Em nosso estudo, independentemente do método de diagnóstico empregado e do tipo de domicílio, foi verificado entre os participantes associação positiva entre infecção por *P. vivax* e presença de sintomas clínicos em diferentes visitas de RCD. Em um estudo transversal em Papua Nova Guiné, verificou-se que cerca de 45% dos casos febris investigados apresentaram lâmina positiva para malária. Entretanto, apenas 72 dos 293 casos positivos (24,6%) por meio do diagnóstico molecular apresentaram sintomatologia clínica (Hetzl et al., 2014). Em uma província localizada ao oeste do Camboja, apesar de os autores verificarem associação limiar ($P = 0,05$) positiva entre a infecção por *P. vivax* diagnosticada por qPCR com presença de febre e histórico de infecção pregressa de malária, concluiu-se que a estratégia de RCD identificou poucos casos secundários entre os domicílios índices e seus vizinhos, sendo a pouco efetiva na área estudada, devido a ocorrência de casos fora da comunidade, além da alta procura por tratamento e cuidados no setor privado da saúde (Hustedt et al., 2016). Na identificação de casos secundários pela RCD em um estudo recente, na Indonésia, casos febris foram estatisticamente associados com o diagnóstico positivo para malária em comparação aos indivíduos não portadores de sintomas clínicos (Herdiana et al., 2016).

Outro grande desafio para a eliminação da malária vivax é a adoção viável de ferramentas para se detectar e quantificar as recaídas tardias da doença, podendo

assim diferenciar as infecções decorrentes da ativação de hipnozoítos, de recrudescências ou de uma nova inoculação de esporozoítos pelo mosquito vetor (Vitor-Silva et al., 2016; Chuquiyauri et al., 2013). Atualmente, a PQ é a única droga disponível contra as formas latentes do *P. vivax* e possui limitações principalmente em relação aos efeitos colaterais, tempo relativamente longo de administração, além do uso em indivíduos com dG6PD. Diferentes ferramentas são utilizadas para identificar e classificar episódios de recaídas. O critério clínico epidemiológico, geralmente utilizado fora da área de transmissão, permite uma definição com certa precisão. Em São Paulo, os autores verificaram que 25% de recaídas entre indivíduos com malária prévia e que não retornaram às áreas endêmicas da doença (Boulos et al., 1999). Em um estudo observacional de 53 casos de portadores de *P. vivax* (alguns co-infectados com *P. falciparum*) realizado entre os anos de 2005 a 2011 no Rio de Janeiro, observou-se nesse período 21 casos de recaídas por *P. vivax*; os autores relataram que a taxa de ativação de hipnozoítos diminuiu à medida que houve o ajuste da dose de PQ por peso do paciente (Pedro et al., 2012). Em relação aos casos índices analisados em nosso estudo, com base no histórico recente de malária vivax, 11 (26,8%) indivíduos foram classificados como possíveis recaídas. Entretanto, o uso somente da classificação epidemiológica tem aplicação limitada em áreas endêmicas e sua análise pode ser dificultada pelo período de incubação do parasito no fígado ser anormalmente prolongado. Métodos de monitoramento, como a sorologia, podem ser úteis para a identificação de recaídas de *P. vivax*, devido a presença de anticorpos anti-esporozoítos e anti-saliva do mosquito vetor poderem indicar exposição dos indivíduos a picada infectante. A limitação desse método deve-se a falta de conhecimento da cinética dos anticorpos, aumentando o risco de classificação equivocada. Ferramentas moleculares são utilizadas para auxiliar na identificação das recaídas por *P. vivax*. Os microssatélites têm sido utilizados em diferentes estudos devido especialmente a padronização da técnica e a grande diversidade de marcadores disponíveis (Imwong et al., 2007, 2012). Em nosso estudo, diferentes genótipos foram caracterizados em três quartos das infecções recorrentes observada nos 54 participantes, sugerindo que as reinfecções ou as recaídas heterólogas (ao invés da recrudescência), recaídas homólogas ou infecções crônicas não tratadas, são responsáveis pela maioria dos episódios repetidos devido à presença do parasito diagnosticado nos focos de malária durante os quatro seguimentos da RCD. Estudos são necessários para explorar as lacunas referentes ao número e o tempo das

recaídas por *P. vivax*, afim de utilizar esses conhecimentos para o desenho de estratégias de combate à malária vivax, especialmente em áreas de baixa transmissão.

Aglomerados de infecções por *P. vivax* em nossas localidades de estudo não foram sinônimo de isolados, fonte comum de surtos envolvendo um ou alguns genótipos do parasito estreitamente relacionados, como descrito recentemente para surtos de *P. falciparum* no Peru (Baldeviano et al., 2015) e Panamá (Obaldia et al., 2015). Pelo contrário, nós evidenciamos uma população altamente diversificada de *P. vivax* em nossa área de estudo, como verificado em áreas endêmicas de localidades adjacentes (Batista et al., 2014; Ferreira et al., 2007; Orjuela-Sánchez et al., 2009), com ampla variedade de genótipos co-circulantes não somente nas proximidades dos casos índices, mas também em torno dos domicílios fora dos aglomerados. Assim, aproximadamente dois terços dos genótipos circulantes dentro de cada aglomerado era único, achado consistente com a introdução contínua de novas linhagens do parasito e baixa transmissão progressiva desses genótipos para os indivíduos vizinhos ao longo dos meses seguintes. Esses dados sugerem que uma substancial proporção das infecções é adquirida fora dos focos de malária operacionalmente definidos.

O paradoxo da alta diversidade genética de *P. vivax* em nosso estudo (área de baixa transmissão de malária), assim como relatado em outros países (Gray et al., 2013; Gunawardena et al., 2014) pode ser consequência da persistência das formas dormentes do parasito em paralelo com clones provenientes de uma nova infecção, já que ambas podem produzir gametócitos rapidamente aumentando assim a chance de recombinações entre as formas sexuais no mosquito vetor. Com o objetivo de verificar a diversidade genética de *P. vivax* em áreas rurais de baixa transmissão de malária na região central do Vietnã, um estudo transversal verificou uma diversidade genética moderada e uma alta ocorrência de infecções policlonais (Hong et al., 2016). De forma contrária, verificou-se que as infecções policlonais foram raras na República da Coreia e que casos de malária introduzidos podem ter contribuído para o aumento da diversidade genética dos parasitos verificada no estudo (Kim et al., 2016).

A diversidade genética encontrada em diferentes focos de transmissão na área rural de Acrelândia evidencia que não há somente a transmissão de um único indivíduo e sim, de outras fontes de infecção. Pode existir uma subestimação em relação aos diferentes genótipos encontrados no estudo devido ao número de

marcadores moleculares utilizados. Assim, estudos de genotipagem na região Amazônica do país (Batista et al., 2015; Ferreira et al., 2007; Orjuela-Sánchez, 2010) e em outros países (Koepfli et al., 2009; Van den Eede, 2010) contribuíram para a escolha dos marcadores genéticos utilizados nesse trabalho.

Há um consenso que os esforços para o sucesso de programas de controle e eliminação da malária requer investimentos a longo prazo (WHO, 2016a). Na América do Sul um ponto importante a se destacar é o modo em que são planejados e executados os programas de eliminação das doenças. Geralmente são feitos de forma fragmentada, não levando em consideração as áreas de fronteiras com outros países, estados e municípios. A generalização dos objetivos dos programas de controle e eliminação da malária na maioria dos países pode muitas vezes não gerar o efeito desejado e esperado pelos órgãos responsáveis como evidenciado em alguns países na África sub-Saariana (Meshnick, 2015). A gestão efetiva no programa de combate à malária é essencial para o sucesso na eliminação da doença (Gosling et al., 2015). Um dos maiores desafios para a sustentabilidade dos avanços no combate à malária ocorre no convencimento dos governantes para alocar recursos (humanos e financeiros) para a manutenção dos programas de eliminação da malária em áreas onde a transmissão decaiu e a presença da doença se dá de maneira residual (Liu et al., 2013). A estratégia de RCD demanda um maior gasto com recursos financeiros afim de que se tenha uma vigilância ativa em torno do caso índice. No Brasil, afim de estimular as iniciativas regionais na eliminação da malária, o Ministério da saúde implementou o projeto de equipe de apoiadores em malária, uma estratégia de apoio aos municípios prioritários na gestão local do controle da malária. Dentre as diversas funções desses servidores está a análise de dados epidemiológicos afim de orientar as intervenções de controle da malária local, de acordo com os protocolos de trabalho do PNCM. Trata-se de um trabalho conjunto com os órgãos de vigilância locais afim de repassar para os serviços de saúde uma metodologia de trabalho que possa ser assumida pelas estruturas de vigilância e controle da malária no estado e no município, perpetuando assim práticas viáveis no controle de malária (Brasil, 2016). O sucesso da estratégia de busca ativa está diretamente relacionada com o número de casos positivos, sazonalidade da transmissão, além da estrutura material e humana que dispõe o sistema de vigilância local. O município de Acrelândia entre os anos de 2009 a 2013 realizava, em média, cerca de 6000 exames de gota espessa por ano para se detectar uma prevalência anual de cerca de 1,5% de casos positivos

para malária. Entretanto, durante o ano de 2013 houve a municipalização do serviço de endemias, ou seja, a transferência por parte do governo federal da gestão dos serviços de endemias para o município. Acrelândia enfrentou nos últimos anos sérios problemas de ordem política e governamental o que influenciou diretamente sobre a piora dos serviços essenciais para a população, incluindo os serviços básicos de saúde e a vigilância de endemias. Reflexo da redução no quadro pessoal de servidores e de recursos destinados ao controle municipal da malária, entre os anos de 2014 e 2015 foram realizados cerca de 2000 exames de microscopia por ano (> 60% por busca passiva) onde a prevalência média de casos por ano se manteve na faixa de 1,5% de casos positivos. Esse quadro atual pode ser um entrave à medida que se necessita de uma vigilância ativa para a detecção de um número menor de casos da doença em áreas que se aproximam da eliminação.

Resultados evidenciados em nosso estudo podem ajudar os gestores na tomada de decisões em relação ao desenho das estratégias para eliminação de malária em localidades de baixa endemicidade, onde o *P. vivax* é a espécie predominante em grande parte dessas áreas, como na maioria dos países da América Latina (Carter et al., 2015). Por meio de nossos achados podemos inferir que a RCD deve ser implementada em áreas de baixa transmissão de malária e para maximizar o impacto da estratégia pode ser levado em consideração os fatores de risco tanto a nível individual (sintomatologia clínica, histórico de malária pregressa) como a nível geográfico (distância de moradia em relação ao caso índice).

Dentre as limitações deste estudo, está a não realização de diagnósticos moleculares (identificação de RNA mensageiro, por exemplo) de forma específica para se detectar a quantidade de formas sexuadas do parasito (gametócitos). Apesar das infecções assintomáticas geralmente estarem associadas às baixas parasitemias sanguíneas e, conseqüentemente poucas formas sexuais, essas formas podem estar implicadas na transmissão do plasmódio para o mosquito vetor. Entretanto, mesmo com a utilização de um método molecular mais sensível, a parasitemia do plasmódio pode não ser estimada de forma precisa pois a parasitemia sanguínea pode flutuar em diferentes períodos da infecção, além dos gametócitos poderem se acumular na derme (Okell et al., 2012). Estudos de painéis podem estar sujeitos a vieses comuns verificados em estudos de prevalência. O viés de observação pode ter ocorrido com o preenchimento dos questionários aplicados no estudo interferindo na medida das variáveis de exposição. Para amenizar esse possível viés, a equipe de campo foi

treinada para aplicar as perguntas de forma uniforme evitando distorções nas respostas por forçar obtenção de respostas positivas ou negativas. Outro potencial erro pode ser devido às lembranças dos participantes (viés de memória) em responderem algumas perguntas referentes aos dados passados. Assim, as perguntas se repetiam em todas as visitas, por exemplo, se o participante já havia contraído malária em algum momento da vida, caso fosse verificado alguma discrepância nas respostas enunciadas pelo indivíduo o questionamento era refeito em um outro momento para se verificar qual a resposta seria a mais precisa. Todas as perguntas aos indivíduos menores de 18 anos eram feitas de forma direta e na presença de pais ou responsáveis. Todos os domicílios participantes do estudo foram registrados em questionário padronizado e tiveram sua localização geográfica marcada, afim de que fosse respeitado a distância mínima para a classificação dos tipos de domicílios participantes. Dados a respeito da recusa de indivíduos em participar do estudo de painel, tanto na entrevista como na doação de material biológico, pode, também, introduzir viés de seleção dos participantes e foram mantidos ao mínimo para garantir a representatividade da amostra. De maneira geral, cerca de 2% do total de participantes se recusaram, em algum momento do estudo, em fornecerem dados epidemiológicos e ou amostras sanguíneas; para esses indivíduos não houve diferença estatisticamente significativa em relação a idade e sexo. Alternativas operacionais (como a execução, pela equipe de pesquisa, de exames hematológicos, coproparasitológico e verificação da pressão sanguínea) foram realizados com o objetivo principal de assistência aos indivíduos participantes e, aumento da adesão ao estudo pelos moradores dos domicílios analisados.

8 CONCLUSÃO

Nós concluímos que o monitoramento por meio de estratégias baseadas na RCD nos moradores dos domicílios índices e domicílios vizinhos pode ser uma ferramenta importante para os esforços de eliminação da malária no Brasil. As infecções assintomáticas e subpatentes que permanecem fora dos focos identificados por meio de portadores sintomáticos, além do alcance dos programas de RCD, podem representar um significativo reservatório do parasito que necessita ser determinado. Estas infecções silenciosas só poderiam ser identificadas por inquéritos com exames de sangue em massa utilizando técnicas de diagnósticos de alta sensibilidade, cuja viabilidade e seu custo-efetividade são atualmente desconhecidos. Finalmente, os dados de genotipagem revelaram redes bastante complexas na transmissão da malária residual nas comunidades rurais amazônicas, de acordo com as várias fontes de infecção, algo que dificulta ainda mais os esforços atuais para eliminação da malária.

REFERÊNCIAS⁷

- Abdallah TM, Abdeen MT, Ashmed IS, Hamdan HZ, Magzoub M, Adam I. Severe *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria among adults at Kassala Hospital, eastern Sudan. *Malar J.* 2013;12:148.
- Abeyasinghe RR, Galappaththy GNL, Smith Gueye C et al. Malaria control and elimination in Sri Lanka: a documenting progress and success factors in a conflict setting. *PLoS One.* 2012;7(8):e43162.
- Aguar ACC, Pereira DB, Amaral NS, De Marco L, Krettli AU. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* ex vivo susceptibility to anti-malarials and gene characterization in Rondônia, West Amazon, Brazil. *Malar J.* 2014;13:73.
- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005;52:399-451.
- Alecrim MGC, Alecrim W, Macêdo V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon Region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32: 67-68.
- Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:641-8.
- Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium spp.* as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol.* 2005;42:777-9.
- Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol.* 2000;14:67-82.
- Anez A, Moscoso M, Laguna, A. Resistance of infection by *Plasmodium vivax* chloroquine in Bolivia. *Malar J.* 2015;14:261.
- APMEN Country Partner Strategy and Intervention Matrices. Asia Pacific Malaria Elimination Network [Internet]. 2011. [Cited from 2013 05 10]. Available from: <http://apmen.org/country-resources/>.
- Arnott A, Barry AE, Reeder JC. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malar J.* 2012;11:14.
- Ashely EA, Dhorda M, Fairhurst RM et al. Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl Med.* 2014;371:411-23.

⁷ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2015 Jul 08]. Available from: <http://www.icmje.org>

Baird K. Origins and implications of neglect of G6PD deficiency and primaquine toxicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Pathog Glob Health*. 2015;109(3):93–106.

Baldeviano GC, Okoth SA, Arrospide N et al. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* malaria outbreak, Tumbes, Peru, 2010-2012. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:797-803.

Ball AD, Stapley J, Dawson DA, Birkhead TR, Burke T et al. A comparasion of SNPs and microsatellites as linkage mapping markers: lessons from the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *BMC Genomics*. 2010;11:218.

Baniecki ML, Faust AL, Schaffner SF, Park DJ, Galinsky K, Daniels RF et al. Development of a Single Nucleotide Polymorphism Barcode to Genotype *Plasmodium vivax* Infections. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):e0003539.

Barbieri AF, Sawyer DO, Soares-Filho B. Population and land use effects on malaria prevalence in the Southern Brazilian. *Human Ecol*. 2005;33:847-74.

Barbieri AF, Sawyer DO. Heterogeneity of malaria prevalence in alluvial gold mining areas in northern Mato Grosso state, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2007;23:2878-86.

Barbosa S, Gozze AB, Lima NF et al. Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* malaria: a case study in rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(8):e3109.

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;377:1877-89.

Batista CL, Barbosa S, Bastos MS et al. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* over time and space: a community-based study in rural Amazonia. *Parasitology*. 2014;142, 374–84.

Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar J*. 2014;13:144.

Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J et al. Common asymptomatic and submicroscopic malaria infections in Western Thailand revealed in longitudinal molecular and serological studies: a challenge to malaria elimination. *Malaria J*. 2016;15:333.

Beavogui AH, Djimde AA, Gregson A et al. Low infectivity of *Plasmodium falciparum* gametocytes to *Anopheles gambiae* following treatment with sulfadoxine-pyrimethamine in Mali. *Int J Parasitol*. 2010;40(10):1213-20.

Bejon P, Williams TN, Liljander A et al. Stable and Unstable Malaria Hotspots in Longitudinal Cohort Studies in Kenya. *PloS Med*. 2010;7(7):e1000304.

Betuela I, Rosanas-Urgell A, Kiniboro B et al. Relapses contribute significantly to the risk of *Plasmodium vivax* infection and disease in Papua New Guinea children 1-5 years of age. *J Infect Dis.* 2012;206(11):1771-80.

Bill & Melinda Gates Foundation. Accelerate progress to eradicate malária. [Internet]. 2016. [Cited from: 2016 04 15]. Available from: <http://www.gatesfoundation.org/What-We-Do/Global-Health/Malaria>

Boulos M, Amato Neto V, Dutra AP, Di Santi SM, Shiroma M. Análise da frequência de recaídas de malária por *Plasmodium vivax* em região não endêmica (São Paulo, Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1991;33:143-6.

Bousema T, Youssef RM, Cook J et al. Serologic markers for detecting malaria in areas of low endemicity, Somalia, 2008. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:392-399.

Bousema T, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews/Microbiology.* 2011;12:833-40.

Bousema T, Griffin JT, Sauerwein RW et al. Hitting Hotspots: Spatial Targeting of Malaria for Control and Elimination. *PLoS Med.* 2012;9:e1001165.

Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev.* 2014;24:377-410.

Brady OJ, Godfray HC, Tatem AJ et al. Vectorial capacity and vector control: reconsidering sensitivity to parameters for malaria elimination. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2016;110(2):107-17.

Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Plano de Intensificação das ações de controle da malária na Amazônia Legal. Brasília: FNS/MS. 2000. [acesso em: 2014 jun 25]. Disponível em: <http://dw.saude.gov.br>.

_____. Ministério da Saúde. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil. 2010. [acesso em: 2012 05 15]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resumo Epidemiológico por local de notificação-Nacional [página da internet]. Brasília: SIVEP-Malária, SVS/MS. 2013. [acesso em: 2014 fev 23]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Malária [página da internet]. Brasília: SVS/MS. 2014a. [acesso em: 2014 mai 16]. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=10933&Itemid=646.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Relatório descritivo – Projeto de Apoiadores Municipais para o Controle de Malária [página da internet]. Brasília: SVS/MS. 2014b. [acesso em: 2015 jun 06]. Disponível em: http://www.fiotech.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=2044:projeto-de-apoiadores-municipais-para-o-controle-de-malaria&catid=206&Itemid=184&lang=pt

_____. Licenciamento ambiental [página da internet]. 2014c. [acesso em: 2016 07 07]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/27/Portaria-01-de-2014.pdf>

_____. Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária. Ministério da Agricultura. Assentamentos. [página da internet]. Brasília: INCRA. 2015a. [acesso em: 2015 fev 10]. Disponível em: <http://www.incra.gov.br/assentamentoscriacao>

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resumo Epidemiológico por local de notificação-Nacional [página da internet]. Brasília: SIVEP-Malária, SVS/MS. 2015b. [acesso em: 2015 dez 21]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resumo Epidemiológico por local de notificação-Nacional [página da internet]. Brasília: SIVEP-Malária, SVS/MS. 2016. [acesso em: 2016 jun 15]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>

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

Buss PM, Pelegrini Filho A. A saúde e seus Determinantes Sociais. Rev Saúde Coletiva. 2007;17(1):77-93

Canfalonieri UEC. Saúde na Amazônia: um modelo conceitual para a análise de paisagens e doenças. Estud. av.2005;19(53):221-36.

Carter KH, Singh P, Mujica OJ et al. Malaria in the Americas: trends from 1959 to 2011. Am J Trop Med Hyg. 2015;92:302-16.

Carlton JM, Adams JH, Silva JC et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. Nature. 2008;455(7214):757-63.

Castro MC, Monter-Mór RL, Sawyer DO, Singer BH. Malaria risk on the Amazon frontier. PNAS. 2006;103(7):2452-57.

Castro MC, Sawyer DO, Singer BH. Spatial patterns of malaria in the Amazon: implications for surveillance and targeted interventions. Health Place. 2007;13:368-80.

Castro, MC; Singer, BH. Meio Ambiente e saúde: metodologia para análise espacial da ocorrência de malária em projetos de assentamentos. Rev bras Est Pop. 2007;24(2): 247-62.

Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, Western Brazilian Amazon? Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33:489-92.

Cavasini CE, Mattos LC, Couto AA et al. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007;101:1042-4.

Chagas C. Luta Contra a Malária. Rio de Janeiro. 1934; p.24.

Chandramhan D, Jaffar S, Greenwood B. Use of clinical algorithms for diagnosing malaria. Trop Med Intern Health. 2002;7:45-52.

Charlwood JD, Alecrim WA. Capture-recapture studies the South American malaria vector *Anopheles darlingi*, Root. An Trop Med Parasitol. 1989;6:569-76.

Chen I, Clarke SE, Gosling R et al. "Asymptomatic" Malaria: A Chronic and Debilitating Infection That Should Be Treated. PLoS Med. 2016;13(1):e1001942.

Cheng Z, Wang D, Tian X et al. Capture and Ligation Probe-PCR (CLIP-PCR) for Molecular Screening, with Application to Active Malaria Surveillance for Elimination. Clin Chem. 2015;61(6):821-8.

Chiyaka C, Tatem AJ, Cohen JM et al. The Stability of Malaria Elimination. Science. 2013;339:909-10.

Clyde DF. Suppression of malaria in Tanzania with the use of medicated salt. Bull World Health Organ. 1966;35:962-8.

Cohen JM, Moonen B, Snow RW, Smith DL. How absolute is zero? An evaluation of historical and current definitions of malaria elimination. Malar J. 2010;9:213.

Congpuong K, SaeJeng A, Sug-aram R, Aruncharus S, Darakapong A et al. Mass blood survey for malaria: pooling and realtime PCR combined with expert microscopy in north-west Thailand. Malar J. 2012;11:288. doi:10.1186/1475-2875-11-288.

Cornejo OE, Escalante AA. The origin and age of *Plasmodium vivax*. Trends Parasitol. 2006;22(12):558–63.

Cortter C, Sturrock H, Hsiang M, Liu J, Phillips A et al. The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. Lancet. 2013;382:900-11.

Coura JR, Suarez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:229-37.

Cook J, Aydin-Schmidt B, González IJ 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.

Cook J, Xu W, Msellem M et al. Mass screening and treatment using a falciparum-specific rapid diagnostics test did not reduce malaria incidence in Zanzibar. *J Infect Dis*. 2015;211:1476-83.

Costa RA. Epidemiologia da malária em Acrelândia – Acre (1999-2002): avaliação e proposições. Rio Branco: Universidade Federal do Acre; 2003. 47 p.

D'Acremont V, Kilowoko M, Kyungu E et al. Beyond malaria--causes of fever in outpatient Tanzanian children. *N Engl J Med*. 2014;370(9):809-17.

da Silva Nunes M. Fatores de risco, distribuição espacial e perspectiva de controle da malária: estudo longitudinal em uma comunidade rural da Amazônia [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

da Silva NS, da Silva-Nunes M, Malafronte RS et al. Epidemiology and control of frontier malaria in Brazil: lessons from community-based studies in rural Amazonia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104:343-50.

da Silva-Nunes M, Codeco CT, Malafronte RS et al. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:624-35.

da Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE et al. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostics challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Trop*. 2012;121:281-91.

De Mast Q, Brouwers J, Syafruddin D et al. Is asymptomatic malaria really asymptomatic? Hematological, vascular and inflammatory effects of asymptomatic malaria parasitemia. *J Infect*. 2015;71(5):587-96.

Deane LM. A história da evolução dos conhecimentos sobre a malária. Rio de Janeiro. Dossiê. Fundação Oswaldo Cruz. Casa de Oswaldo Cruz. 1986;105p.

Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38:223-30.

Delgado-Ratto C, Soto-Calle VE, Van den Eede P et al. Population structure and spatio-temporal transmission dynamics of *Plasmodium vivax* after radical cure treatment in a rural village of the Peruvian Amazon. *Malar J*. 2014;13:8.

Diez-Roux AV, Aiello AE. Multilevel Analysis of Infectious Diseases. *J Infect Dis*. 2005;191:S25-33.

Domingo GJ, Satyagraha AW, Anvikar A et al. G6PD testing in support of treatment and elimination of malaria: recommendations for evaluation of G6PD tests. *Malar J*. 2013;12:391.

Duarte EC, Pang LW, Ribeiro LC, Fontes CJ. Association of subtherapeutic dosages of a standard drug regimen with failures in preventing relapses of vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:471-6.

El-Moamly. Malaria elimination: needs assessment and priorities for the Future. *J Infect Dev Ctries*. 2013;7(11):769-80.

Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 2004;5:435-45.

Escalante AA, Ferreira MU, Vinetz JM et al. Malaria Molecular Epidemiology: Lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(Suppl 3):79–86.

Farid MA. The malaria programme – from euphoria to anarchy. Division of Malaria Eradication, WHO, Geneva, Switzerland. *World Health Forum*. 1980;1:8-33.

Feng X., Carlton JM, Joy DA, Mu J, Furuya T et al. Single-nucleotide polymorphism and genome diversity in *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 2003;100:8502-07.

Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M et al. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J Infect Dis*. 2007;195:1218-26.

Ferreira MU. *Parasitologia Contemporânea*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016;15:284.

Galatas B, Bassat Q, Mayor A. Malaria Parasites in the Asymptomatic: Looking for the Hay in the Haystack. *Trends Parasitol*. 2016;32(4):296-308.

Garret-Jones C. The Human Blood Index of malaria Vectors in Relation to Epidemiological Assessment. *Bull World Health Organ*. 1964;30:241-61.

Genton B, D' Acremont V, Rate L et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med*. 2008;5:e127.

Giglioli G, Rutten FJ, Ramjattan S. Interruption of malaria transmission by chloroquinized salt in Guyana, with observations on a chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum*. *Bull World Health Organ*. 1967;36:283-301.

Gonçalves RM, Scopel KK, Bastos MS, Ferreira MU. Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? PLoS One. 2012;7(9):e44394.

Gonzales-Ceron L, Rodrigues MH, Sandoval MA et al. Effectiveness of chloroquine and primaquine treatment in 14 days versus intermittent single dose regimen, in an open, non-randomized, clinical trial, to eliminate *Plasmodium vivax* in Southern Mexico. Malar J. 2015;14:426.

Gray K-A, Dowd S, Bain L, et al. Population genetics of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and asymptomatic malaria in Temotu Province, Solomon Islands. Malar J. 2013;12:429.

Gundry, CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. Clinical Chemistry. 2003;49:396-406.

Gunawardena S, Ferreira M, Kapilananda G, Whirth D, Karunaweera N. The Sri Lanka paradox: high genetic diversity in *Plasmodium vivax* populations despite decreasing levels of malaria transmission. Parasitology. 2014;141:880-90.

Havryliuk T, Ferreira MU. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(1):67-73.

Harris I, Sharrock W, Bain LM et al., 2010. A large proportion of asymptomatic *Plasmodium* infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting. Mal J. 2010;9:254.

Herdiana H, Cotter C, Coutrier FN et al. Malaria risk factor assessment using active and passive surveillance data from Aceh Besar, Indonesia, a low endemic, malaria elimination setting with *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium falciparum*. Malar J. 2016;15:468.

Hetzel MW, Paul S, Benjamin L, Makita L, Mueller I, Siba PM. The proportion of fevers attributable to malaria varies significantly between sites in Papua New Guinea. PNG Med J. 2014;57(1-4):39-51.

Hong NV, Delgado-Ratto C, Thanh PV et al. Population Genetics of *Plasmodium vivax* in Four Rural Communities in Central Vietnam. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):e0004434.

Hox J. Applied multilevel analysis. Amsterdam: TTPublikaties. 1995;126p.

Hwang SY, Kim SH, Lee GY et al., 2011. A novel real-time PCR assay for the detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in low parasitized individuals. Acta Trop. 2011;120 (1-2):40-5.

Imwong M, Sudimack D, Pukrittayakamee S et al. Microsatellite variation, repeat array length, and population history of *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol*. 2006;23:1016-18.

Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S et al. Relapses of *Plasmodium vivax* Infectious Usually Result from Activation of Heterologous Hypnozoites. *J Infect Dis*. 2007;195:927-33.

Imwong M, Machteld EB, Whatcharee P et al. The first *Plasmodium vivax* Relapses of Life Are Usually Genetically Homologous. *J Infect Dis*. 2012;205:680-3.

Imwong M, Nguyen TN, Tripura R et al., 2015. The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: findings from cross-sectional surveys in Thailand–Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam. *Malar J*. 2015;14:381.

Imwong M, Stepniewska K, Tripura R et al., 2015. The numerical distributions of parasite densities in asymptomatic malaria. *J Infect Dis*. 2016;213(8):1322-9.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Contagem da população em 2010. Rio de Janeiro: IBGE. 2010. [acesso em: 2014 out 06]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>.

_____. Histórico do Município. Rio de Janeiro: IBGE. 2014. [acesso em: 2014 out 06]. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/painel/historico.php?lang=&codmun=120001&search=acrelacrelandia|infograficos:-historico>

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. INPE. Calculadora geográfica. 2013. [acesso em: 2013 jan 29]. Disponível em: <http://www.dpi.inpe.br/calcula/>

Jakobsen PH, Moris-Jones S, Ponn A et al. Increased plasma concentrations of sICAM-1, sVCAM-1 and sELAM-1 in patients with *Plasmodium falciparum* or *P. vivax* malaria and association with disease severity. *Immun*. 1994;83:665-9.

Karunaweera ND, Ferreira MU, Hartl DL, Wirth DF. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Mol Ecol Notes*. 2007;7:172–5.

Karunajeera HA, Mueller I. How important is gametocyte clearance after malaria therapy? *BMC Med*. 2016; 14:93.

Kim JY, Kim HH, Na BK, et al. Estimating the malaria transmission of *Plasmodium vivax* based on serodiagnosis. *Malar J*. 2012;11:257.

Kim JY, Goo YK, Zo YG et al. Further Evidence of Increasing Diversity of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea in Recent Years. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151514.

Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi Y, Tanabe K, 1997. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int*. 1997;46:91-5.

Kiszewski A, Mellinger A, Spielman A, Malaney P, Sachs SE, Sachs J. A global index representing the stability of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70:486-98.

Kochar DK, Das A, Kochar SK et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *Am J Med Hyg.* 2009;80:194-8.

Koepfli C, Mueller I, Marfurt J et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *J Infect Dis.* 2009;199(7):1074-80.

Koepfli C, Ross A, Kinoboro B et al. Multiplicity and diversity of *Plasmodium vivax* in a highly endemic region in Papua New Guinea. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(12):e1424.

Koepfli C, Robinson LJ, Rarau P et al. Blood-stage parasitaemia and age determine *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* gametocytaemia in Papua New Guinea. *PLoS ONE.* 2015;10:e0126747.

Kone A, van de Vegte-Bolmer M, Siebelink-Stoter R et al. Sulfadoxine-pyrimethamine impairs *Plasmodium falciparum* gametocyte infectivity and *Anopheles* mosquito survival. *Int J Parasitol.* 2010;40(10):1221-8.

Kunene S, Phillips AA, Gosling R, Kandula D, Novotny JM. A national policy for malaria elimination in Swaziland: a first for sub-Saharan Africa. *Malar J.* 2011;10:313.

Lacerda MVG, Mourão MPG, Alexandre MAA et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J.* 2012;11:12.

Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:452-8.

Ladislau JLB, Leal MC, Tauil PL. Avaliação do Plano de Intensificação das Ações de Controle de Malária na região da Amazônia Legal, Brasil, no contexto da descentralização. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2009;15(2):9-20.

Laishram DD, Sutton PL, Nanda N et al. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malar J.* 2012;11:29.

Laserson KF, Wypij D, Petralanda I, Spielman A, Maguire JH. Differential perpetuation of malaria species among Amazonian Yanomami Amerindians. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(5):767-73.

Lek D, Popovici J, Arieu F et al. National Malaria Prevalence in Cambodia: Microscopy versus Polymerase Chain Reaction Estimates. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(3):588-94.

Lima NF, Bastos MS, Ferreira MU. *Plasmodium vivax*: Reverse transcriptase real-time PCR for gametocyte detection and quantitation in clinical samples. *Exp Parasitol.* 2012;132:348-54.

Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A et al. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect.* 2013;11(6):623-39.

Litsios S. The tomorrow of malaria. Wellington: Pacific Press. 1997;186p.

Littrell M, Sow GD, Ngom A et al. Case investigation and reactive case detection for malaria elimination in northern Senegal. *Malar J.* 2013;12:331.

Liu J, Modrek S, Gosling et al. Malaria eradication: is it possible? Is it worth it? Should we do it? *Lancet.* 2013;1:e2-e3.

Loiola CCP, Silva CJM, Tauil PL. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 2002;11(4):235-44.

London School Hygiene and Tropical Medicine. Ronald Ross - Biographical". Nobelprize.org. Nobel Media AB. 2014. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1902/ross-bio.html (acessado: 15/06/2016).

Lu Y, Dendukuri N, Schiller I, Joseph L. A Bayesian approach to simultaneously adjusting for verification and reference standard bias in diagnostic test studies. *Stat Med.* 2010;29:2532-43.

Mbakilwa H, Manga C, Kibona S et al. Quality of malaria microscopy in 12 district hospital laboratories in Tanzania. *Pathog Glob Health.* 2012;106:330-4.

Macauley C. Aggressive active case detection: a malaria control strategy based on the Brazilian model. *Soc Sci Med.* 2005;60:563-73.

MacDonald G. The epidemiology and control of malaria. Oxford University Press, London. 1957.

Maheu-Giroux M, Castro MC. Impact of Community-Based Larviciding on the Prevalence of Malaria Infection in Dar es Salaam, Tanzania. *PLoS One.* 2013;8(8):e71638.

Massad E, Menezes RX, Ortgega NRS, Silveira PSP. Métodos Quantitativos em Medicina. São Paulo: Manole; 2003.

Marques AC. Human migration and the spread of malaria in Brazil. *Paras Today.* 1987;3(6):166-70.

Martins AC, Lins JB, Santos LM et al. Vivax malaria in an Amazonian child with dilated cardiomyopathy. *Malar J.* 2014;13:61.

Mckenzie FE, Wongsrichanalai C, Magill AJ et al. Gametocytemia in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections. *J Parasitol.* 2006;92:1281-5.

Medina-Morales DA, Montoya-Franco E, Sanchez-Aristizabal VD, Machado-Alba JE, Rodriguez-Morales AJ. Severe and benign *Plasmodium vivax* malaria in Emberá

(Amerindian) children and adolescent from an endemic municipality in Western Colombia. *J Infect Public Health*. 2016;9(2):172-80.

Melo GC, Monteiro WM, Siqueira AM et al. Expression levels of *pvcrt-o* and *pvm-dr-1* are associated with chloroquine resistance and severe *Plasmodium vivax* malaria in patients of the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2014;9(8):e105922.

Ménard D, Barnadas C, Bouchier C et al., 2010. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Nat Acad Sci* 107:5967-71.

Mendes C, Dias F, Figueiredo J et al. Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax*-molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1192.

Mendonça VR, Souza LC, Garcia GC et al. Associations between hepcidin and immune response in individuals with hyperbilirubinaemia and severe malaria due to *Plasmodium vivax* infection. *Malar J*. 2015;14(1):407.

Meshnick, SR. Malaria Control. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(5):885-6.

Mittal M, Jain R, Talukdar B, Kumar M, Kapoor K. Emerging new trend of malaria in children: a study from a tertiary care centre in northern India. *J Vector Borne Dis*. 2014;51(2):115-8.

Moitinho PR, Gil LHS, Cruz RB, Ribolla PEM, 2011. Population dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. *Malaria J*. 2011;10:174.

Monteiro WM, Franca GP, Melo GC, Queiroz ALM, Brito M. Clinical complications of G6PD deficiency in Latin American and Caribbean populations: systematic review and implications for malaria elimination programmes. *Malar J*. 2014;13:70.

Monteiro WM, Val FFA, Siqueira AM, Franca GP, Sampaio VS. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):553-68.

Monteiro THA, Chaves TSS, Matos HJ et al. Basic sanitation, socioeconomic conditions, and degree of risk for the presence and maintenance of malaria in a low-transmission area in the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48:573-9.

Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:66-78.

Moreira CM, Abo-Shehadeh M, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malar J*. 2015;14:360.

Motshoge T, Ababio GK, Aleksenko L et al. Molecular evidence of high rates of asymptomatic *P. vivax* infection and very low *P. falciparum* malaria in Botswana. *BMC Infect Dis*. 2016;16:520.

Mueller I, Galinski MR, Baird JK et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:555-66.

Mu J, Awadalla P, Duan J et al. Recombination hotspots and population structure in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*. 2005;3e:335.

Murray CK, Gasser Jr. RA, Magill AJ, Miller RS. Update on Rapid Diagnostic Testing for Malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2009;21:97-110.

Nankabirwa J, Wandera B, Kiwanuka N et al. Asymptomatic *Plasmodium* infection and cognition among primary schoolchildren in a higher malaria transmission setting in Uganda. *Am J Trop Med*. 2013;88(6):1102-8.

Neiva A. A profilaxia da malária e trabalhos de engenharia: notas, comentários, recordações. *Revista do Clube de Engenharia*. 1940;6:60-75.

Newby G, Hwang J, Koita K et al. Review of Mass Drug Administration for Malaria and Its Operational Challenges. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(1):125-34.

Newby G, Bennett A, Larson E et al. The path to eradication: a progress report on the malaria-eliminating countries. *Lancet*. 2016;387:1775-84.

Nosten F, Luxemburger C, ter Kuile FO, Woodrow C, Chong-suphajaisiddhi T, White NJ. Treatment of multi drug resistant *Plasmodium falciparum* malaria with 3 days artesunate-mefloquine combination. *J Infect Dis*. 1995;170:971-7.

Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol*. 2015;53(1):1-5.

Nurleila S, Syafruddin D, Elyazar IR, Baird JK. Serious and fatal illness associated with falciparum and vivax malaria among patients admitted to hospital at West Sumba in eastern Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87(1):41-9.

Obaldia N 3rd, Baro NK, Calzada JE et al. Clonal outbreak of *Plasmodium falciparum* infection in eastern Panama. *J Infect Dis*. 2015;211:1087-96.

Okell LC, Bousema T, Griffin JT et al. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun*. 2012;3:1237.

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(1):2-13.

Orjuela-Sánchez P, da Silva-Nunes M, da Silva NS et al. Population dynamics of genetically diverse *Plasmodium falciparum* lineages: community-based prospective study in rural Amazonia. *Parasitology*. 2009;136:1097-105.

Orjuela-Sánchez P, da Silva NS, da Silva-Nunes M et al. Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:961-8.

Orjuela-Sánchez P. Diversidade genética em populações de *Plasmodium vivax*: análise de marcadores genéticos neutros e de genes potencialmente associados à resistência a drogas. [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.

Orjuela-Sánchez P, Karunaweera NK, da Silva-Nunes M et al. Single-nucleotide polymorphism, linkage disequilibrium and geographic structure in the malaria parasite *Plasmodium vivax* prospects for genome-wide association studies. *BMC Genetics.* 2010;11:65-76.

Pampana E. A textbook of malaria eradication. Oxford University Press. 1963;2nd ed :593p.

Pan American Health Organization. Report on the Situation of Malaria in the Americas, 2008. Washington, DC: Pan American Health Organization. 2009.5p.

_____. Report on the Situation of Malaria in the Americas, 2013. Washington, DC: Pan American Health Organization. 2014. [Cited from: 2014 08 12]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=33&Itemid=40757&lang=en

_____. Interactive malaria statistics. Washington, DC. 2016a. [Cited from: 2016 05 30]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&ask=view&id=2632&Itemid=2130

_____. La OPS/OMS premia proyectos de República Dominicana, Guatemala y Honduras por sus logros en prevención y control de la malaria. Washington, DC. 2016b. [Cited from: 2016 06 01]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10188%3A2014-pahowho-honors-dominican-honduras-malaria&Itemid=1926&lang=es

Pearson RD, Amato R, Auburn S et al. Genomic analysis of local variation and recent evolution in *Plasmodium vivax*. *Nature Genetics.* 2016;48, 959–64. doi: 10.1038/ng.3599

Pedro RS, Guaraldo L, Campos DP, Costa AP, Daniel-Ribeiro CT, Brasil P, 2012. *Plasmodium vivax* malaria relapses at a travel medicine centre in Rio de Janeiro, a non-endemic area in Brazil. *Malar J.* 2012;11:245.

Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC et al., 2015. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(1):23-47.

Pina-Costa A, Brasil P, Santi SMD et al., Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:618-33.

Pínotti M, Lôbo AGS, Damasceno G, Soares R. Experiências de campo com o sal cloroquinado. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. 1955;7:5-23.

Poirot E, Skarbinski J, Sinclair D et al. Mass drug administration for malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;12:163p.

Pourmoshtagh H, Fahimzah A, Karimi A. Comparison of polymerase chain reaction (PCR) and peripheral blood smear (PBS) for diagnosis of asymptomatic malaria parasitemia. *Iran J Clin Infect Dis*. 2012;7:7-9.

Pöschl B, Waneesorn J, Thekisoe O, Chutipongvivate S, Panagiotis K. Comparative Diagnosis of Malaria Infections by Microscopy, Nested PCR, and LAMP in Northern Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83:53-60.

Premanath M. Control of Malaria. The rapid fever surveillance programme. *J Assoc Physicians India*. 1997;45:853-6.

Proietti C, Verra F, Bretscher MT et al. Influence of infection on malaria-specific antibody dynamics in a cohort exposed to intense malaria transmission in northern Uganda. *Parasite Immunol*. 2013;35:164-73.

QGIS. Programa livre; 2014. Disponível em: <http://qgis.org/em/site>

Qing HY. Malaria in Yuanyang, Yunnan, People's Republic of China--new control strategy (1992 -1996). *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2000;31(3):431-3.

Rajapakse S, Rodrigo C, Fernando SD. Tafenoquine for preventing relapse in people with *Plasmodium vivax* malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;29(4).

Reid H, Valley A, Taleo G et al. Baseline spatial distribution of malaria prior to an elimination programme in Vanatu. *Malaria J*. 2010;9:150. doi: 10.1186/1475-2875-9-150.

Reis IC, Honório NA, Barros FSM, et al. Epidemic and Endemic Malaria Transmission Related to Fish Farming Ponds in the Amazon Frontier. *PLoS ONE*. 2015;10(9): e0137521.

Rey L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Rezende AM, Tarazona-Santos E, Fontes CJ et al. Microsatellite loci: determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. *Trop Med Int Health*. 2010;15:718-26.

Robinson LJ, Wampfler R, Betuela I et al. Strategies for Understanding and Reducing the *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* Hypnozoite Reservoir in Papua New Guinean Children: A Randomised Placebo-Controlled Trial and Mathematical Model. *PLoS Med*. 2015;12(10): e1001891.

Rosas-Aguirre A, Speybroeck N, Llanos-Cuentas A et al., 2015. Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PLoS One*. 2015;10(9): e0137458.

Rosen G. Da polícia médica à medicina social. Rio de Janeiro. Graal. 1980.

Roshanravan B, Kari E, Gilman RH et al., 2003. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69:45-52.

Ryan JR, Stoute JA, Amon J et al. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(4): 575-81.

Sallum MA, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, Dos Santos CL. Insight into *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) species from Brazil. *J Med Entomol.* 2008;45:970-81.

Sanders K, Gueye CS, Phillips AA, Gosling R. Active Case Detection for Malaria Elimination: a Confusion of Acronyms and Definitions. *Malar Chemo Contr Elim.* 2012;1. D 235552, 5p.

Santana Filho FS, Arcanjo ARL, Chehuan YM et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1125-26.

Sattabongkot J, Tsuboi T, Zollner GE et al. *Plasmodium vivax* transmission: changes for control? *Trends Parasitol.* 2004;20:4.

Saravu K, Rishikesh K, Kamath A. Determinants of mortality, intensive care requirement and prolonged hospitalization in malaria - a tertiary care hospital based cohort study from South-Western India. *Malar J.* 2014;13:370.

Sawyer DR. Frontier malaria in the Amazon region of Brazil: types of malaria situations and some implications for control. Brasília: PAHO/WHO/TDR. 1988.

Scopel KKG, Fontes CJ, Nunes AC Horta MF, Braga EM. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiácas-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop.* 2005;90: 61-4.

Scrimgeour EM, Mehta FR, Suleiman AJ, 1999. Infectious and tropical diseases in Oman: A review. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(6):920-5.

Searle KM, Shields T, Hamapumbu H et al. Efficiency of household reactive case detection for malaria in rural Southern Zambia: simulations based on cross-sectional surveys from two epidemiological settings. *PLoS One.* 2013;8:e70972.

Searle KM, Hamapumbu H, Lubinda J et al., 2016. Evaluation of the operational challenges in implementing reactive screen-and-treat and implications of reactive case detection strategies for malaria elimination in a region of low transmission in southern Zambia. *Malar J.* 2016;15:412.

Shanks GD, White NJ, 2013. The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13:900-6.

Shaw-Saliba K, Clarke D, Santos JM et al. Infection of laboratory colonies of *Anopheles* mosquitoes with *Plasmodium vivax* from cryopreserved clinical isolates. *Int J Parasitol*. 2016;46(11):679-83.

Shaw-Saliba K, Thonson-Luque R, Obaldía III N et al. Insights into an Optimization of *Plasmodium vivax* Sal-1 In Vitro Culture: The Aotus Primate Model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(7): e0004870.

Shute PG, Maryon M. A Note on the Infectivity to Mosquitos of Patients in the Asymptomatic, Symptomatic and Post-symptomatic Phases of Parasitic Relapses of Induced Infections with *Plasmodium vivax* (Madagascar Strain). *Bull World Health Organ*. 1961;24:654-7.

Silva R, Hochman G. Um método chamado Pínotti: sal medicamentoso, malária e saúde internacional (1952-1960). *Hist Ciênc Saúde Manguinhos*. 2011;18: 519-44.

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 Ciênc Saúde Manguinhos*. 2015;22:95-114.

Silveira AC, Rezende DF. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil. [página da internet]. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2001;p.120. [acesso em: 2015 nov 03]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro_aval_malaria.pdf

Simões LR, Alves-Jr ER, Ribatski-Silva D et al. Fatores associados às recidivas de malária causada por *Plasmodium vivax* no Município de Porto Velho, Rondônia, Brasil, 2009. *Cad Saúde Pública*. 2014;30(7):1-15.

Simon C, Haque U, Chanda E et al. Malaria control in Botswana, 2012–2014: achievements and challenges. *Parasit Vectors*. 2016;9:99.

Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors*. 2010;3:72.

Singer BH, Castro MC. Agricultural colonization and malaria on the Amazon frontier. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;954:184-222.

Smith DL, Hay SI, Noor AM, Snow RW. Predicting changing malaria risk after expanded insecticide-treated net coverage in Africa. *Trends Parasitol*. 2009;25:111-6.

Smith Gueye C, Sanders KC, Galappaththy GN et al., Active case detection for malaria elimination: a survey among Asia Pacific countries. *Malaria J*. 2013;12:358.

Snow RW, Marsh K. New insights into the epidemiology of malaria relevant for disease control. *Br Med Bull*. 1998;54:293-309.

Stresman GH, Kamanga A, Moono P et al. A method of active case detection to target reservoirs of asymptomatic malaria and gametocyte carriers in a rural area in Southern Province, Zambia. *Malar J*. 2010;9:29.

Stresman GH, Baidjoe AY, Stevenson J et al. Focal Screening to Identify the Subpatent Parasite Reservoir in an Area of Low and Heterogeneous Transmission in the Kenya Highlands. *J Infect Dis*. 2015;212:1768-77.

Sturrock HJW, Hsiang MS, Cohen JM et al. Targeting Asymptomatic Malaria Infections: Active Surveillance in Control and Elimination. *PLoS Med*. 2013a;10(6):e1001467.

Sturrock HJW, Novotny JM, Kunene S et al. Reactive Case Detection for malaria elimination: real-life experience from an ongoing program in Swaziland. *PLoS One*. 2013b;e63830.

Sutcliffe CG, Kobayashi T, Hamapumbu H et al. Reduced risk of malaria parasitemia following household screening and treatment: a cross-sectional and longitudinal cohort study. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31396.

Suarez-Mutis MC, Cuervo P, Leoratti FMS et al. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. *Rev Inst Med Trop*. 2007;49(3):159-64.

Tada MS, Marques RP, Mesquita E et al. Urban malaria in the Brazilian Western Amazon Region I: high prevalence of asymptomatic carriers in an urban riverside district is associated with a high level of clinical malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:263-9.

Tarimo DS. Community Knowledge and Perceived Effectiveness of Interventions to Reduce Malaria: Implications for Sustained Use of Malaria Interventions in Rufiji District, Southeastern Tanzania. *Int Q Community Health Educ*. 2015;35(4):335-47.

Tatarsky A, Aboobakar S, Cohen JM et al. Preventing the reintroduction of malaria in Mauritius: a programmatic and financial assessment. *PLoS One*. 2011;6(9):e23832.

Tauil PL. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(Suppl.1):105-6.

Tiono A, Ouedraogo A, Ogutu et al. A controlled, parallel, cluster-randomized trial of community-wide screening and treatment of asymptomatic carriers of *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso. *Malar J*. 2013;12:79.

Thomsom-Luque, Scopel KKG. Immature reticulocytes as preferential host cells and the challenges for in vitro culture of *Plasmodium vivax*. *Pathog Glob Health*. 2015;9(3):91-2.

Trape JF, Tall A, Sokhna C et al. The rise and fall of malaria in a west African rural community, Dielmo, Senegal, from 1990 to 2012: a 22 year longitudinal study. *Lancet Infect Dis*. 2014;14: 70712-21.

Tusting LS, Willey B, Lucas H et al. Socioeconomic development as an intervention against malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2015;382(9896):963-72.

Val FF, Sampaio VS, Cassera MB et al. *Plasmodium vivax* malaria elimination: should innovative ideas from the past revisited? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):522-24.

Vallejo A, Garcia J, Amado-Garavito A et al. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in submicroscopic infections. *Malar J*. 2016;15:48.

Van den Eede P, Van der Auwera G, Delgado C et al. Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. *Malar J*. 2010;9:151.

Van den Eede P, Erhart A, Van der Auwera G et al. High complexity of *Plasmodium vivax* infections in symptomatic patients from a rural community in central Vietnam detected by microsatellite genotyping. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:223-7.

van Eijk AM, Ramanathapuram L, Sutton PL et al. What is the value of reactive case detection in malaria control? A case-study in India and a systematic review. *Malar J*. 2016;16:67.

Vázquez-Jiménez JM, Arévalo-Herrera M, Henao-Giraldo J et al. Consistent prevalence of asymptomatic infections in malaria endemic populations in Colombia over time. *Malar J*. 2016;15:70.

Vizzi E, Bastistas G, Hidalgo M et al. Prevalence and molecular characterization of G6PD deficiency in two *Plasmodium vivax* endemic areas in Venezuela: predominance of the African A-^{202A/376G} variante. *Malar J*. 2016;15:19.

Vitor-Silva S, Siqueira AM, Sampaio VS et al. Declining malaria transmission in rural Amazon: changing epidemiology and challenges to achieve elimination. *Malar J*. 2016;15:266.

Vittor AY, Gilman RH, Tielsch J et al. The effects of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of falciparum malaria in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74:3-11.

von Seidlein L, Greenwood BM. Mass administrations of antimalarial drugs. *Trends Parasitol*. 2003;19:452-60.

von Seidlein L. The failure of screening and treating as a malaria elimination strategy. *PLOS Med*. 2014;11: e1001595.

Waltmann A, Darcy AW, Harris I et al. High rates of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection and disappearing *Plasmodium falciparum* malaria in an area of low transmission in Solomon Island. *PLOS Neg Trop Dis*. 2015; 21;9(5):e0003758.

Wammes LJ, Wiria AE, Toenhake CG et al. Asymptomatic plasmodial infection is associated with increased tumor necrosis factor receptor II-expressing regulatory T cells and suppressed type 2 immune responses. *J Infect Dis*. 2013;207(10):1590-9.

White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2011;10(1):297.

White MT, Karl S, Battle KE et al. Modelling the contribution of the hypnozoite reservoir to *Plasmodium vivax* transmission. *eLife*. 2012;3:e04692.

White NJ, Imwong M. Relapse. *Adv Paras*. 2012;80:113-50.

World Health Organization. Malaria elimination: a field manual for low and moderate endemic countries. [Internet]. Geneva. 2007. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241596084/en/> [Cited: 2014 jun 10].

_____. Definitions of control, elimination, certification and eradication (Global Malaria control and elimination: Report of a technical review. [Internet]. Geneva. 2008. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241596756/en/index.html> [Cited: 2015 may 27].

_____. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. [Internet]. Geneva. 2009. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597531_eng.pdf [Cited: 2013 may 12].

_____. Universal access to malaria diagnostic testing – An Operational Manual. [Internet]. Geneva. 2011. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241502092/en/> [Cited: 2013 apr 12].

_____. Disease Surveillance for Malaria Control – An Operational Manual. [Internet]. Geneva. 2012a. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241503341/en/> [Cited: 2015 feb 13].

_____. Disease surveillance for malaria elimination – An Operational Manual. [Internet]. Geneva. 2012b. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/978924150334/en/index.html> [Cited: 2013 oct 10].

_____. WHO interim position statement: the role of larviciding form malaria control in sub-Saharan Africa. [Internet]. Geneva. 2012c. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/interim_position_statement_larviciding_sub_saharan_africa.pdf [Cited: 2016 feb 15].

_____. WHO guidance note on capacity building in malaria entomology and control vector. [Internet]. Geneva. 2013. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_guidance_capacity_building_entomology.pdf [Cited: 2014 may 25].

_____. Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030. [Internet]. Geneva. 2015a. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/en/> [Cited: 2016 aug 23].

_____. Control and Elimination of *Plasmodium vivax* malaria. [Internet]. Geneva. 2015b. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/181162/1/9789241509244_eng.pdf?ua=1&ua=1 [Cited: 2015 may 10].

_____. Malaria Report. [Internet]. Geneva. 2015c. Available from: <http://apps.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/en/index.html> [Cited: 2016 feb 02].

_____. Confronting *Plasmodium vivax* malaria. [Internet]. Geneva. 2015d. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/181163> [Cited: 2016 jul 15].

_____. Eliminating malaria. [Internet]. Geneva. 2016a. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/eliminating-malaria/en/> [Cited: 2016 may 12].

_____. WHO malaria terminology. [Internet]. Geneva. 2016b. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/malaria-terminology/en/> [Cited: 2016 jul 16].

Yapabandara MAMG, Sarmento R, Mota MRF, don Bosco J, Martins N, Wickremasinghe AR. Evidence-based malaria control in Timor Leste from 2006 to 2012. *Malar J*. 2015;14:109.

Yekutieli P. Problems of epidemiology in malaria eradication. *Bull World Health Organ*. 1960;22:669-83.

Zhou G, Afrane YA, Malla S et al.. Active case surveillance, passive case surveillance and asymptomatic malaria parasite screening illustrate different age distribution, spatial clustering and seasonality in western Kenya. *Malar J*. 2015;14:41.

Zizhao L, Luoyuan S, Lian Z, Dongfang L, Yunpu S. Control strategies of malaria in Henan Province, China. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999;30(2):240-2.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (MAIORES DE 18 ANOS DE IDADE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Investigação de reservatórios para malária residual por *Plasmodium vivax* em área rural da Amazônia”

Eu, _____, com _____ anos de idade, fui contatado(a) por um membro ou representante da equipe de pesquisa coordenada pelo professor Dr. Marcelo Urbano Ferreira, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e solicitado(a) a doar uma pequena quantidade do meu sangue para utilização nos estudos do projeto de pesquisa sobre malária citado acima. Fui informado(a) que este projeto pretende avaliar uma nova estratégia para identificar indivíduos com malária, mesmo aqueles que não apresentam sintomas, de forma a contribuir para acabar com a malária na comunidade. Para tanto, os pesquisadores necessitam de uma amostra de sangue de membros da comunidade que residem próximos a indivíduos que apresentam malária. As amostras de sangue serão colhidas por meio de punção em polpa digital (aproximadamente três gotas de sangue da “ponta” do dedo) ou punção venosa (aproximadamente 4 ml de sangue colhido da veia), no momento do recrutamento para a pesquisa, e um, dois e seis meses após a primeira visita. Fui esclarecido(a) que sentirei o equivalente a uma “picada de agulha”, e que os riscos deste procedimento são mínimos, em nada alterando o meu tratamento para malária. Fui esclarecido(a) também que a minha participação voluntária é muito importante para o estudo desenvolvido pelos pesquisadores e que posso desistir da participação no estudo a qualquer momento durante sua realização, sem qualquer prejuízo. Finalmente, fui informado(a) que as informações sobre a minha pessoa e a minha participação no estudo serão mantidas em sigilo.

Considero-me satisfeito(a) com as explicações fornecidas e concordo em participar como voluntário(a) deste estudo.

Acrelândia, _____ de _____ de 2013.

Nome: _____

Assinatura: _____

Marcelo Urbano Ferreira ou Pablo Secato Fontoura

(Documento em duas vias, 01 para o voluntário, 01 para o pesquisador)

Endereço para contato:

Unidade Mista de Saúde de Acrelândia, Av. Paraná s/n, Centro, Acrelândia (AC)

Telefone: (68) 3235-1188, Celular (68) 9984-4921

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (MENORES DE 18 ANOS DE IDADE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Investigação de reservatórios para malária residual por *Plasmodium vivax* em área rural da Amazônia”

Eu, _____, com _____ anos de idade, fui contatado(a) por um membro ou representante da equipe de pesquisa coordenada pelo professor Dr. Marcelo Urbano Ferreira, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e solicitado(a) a permitir a coleta de uma pequena quantidade de sangue de meu(minha) filho(a) menor de idade para utilização nos estudos do projeto de pesquisa sobre malária citado acima. Fui informado(a) que este projeto pretende avaliar uma nova estratégia para identificar indivíduos com malária, mesmo aqueles que não apresentam sintomas, de forma a contribuir para acabar com a transmissão da malária na comunidade. Para tanto, os pesquisadores necessitam de uma amostra de sangue de membros da comunidade que residem próximos a indivíduos que apresentam malária. As amostras de sangue serão colhidas por meio de punção em polpa digital (aproximadamente três gotas de sangue colhido da “ponta” do dedo) ou punção venosa (aproximadamente 4 ml de sangue colhido da veia), no momento do recrutamento para a pesquisa, e um, dois e seis meses após a primeira visita. Fui esclarecido(a) que meu(minha) filho(a) sentirá o equivalente a uma “picada de agulha”, e que os riscos deste procedimento são mínimos, em nada alterando o seu tratamento para malária. Fui esclarecido(a) também que a participação voluntária do(a) meu(minha) filho(a) é muito importante para o estudo desenvolvido pelos pesquisadores e que posso desistir da participação no estudo a qualquer momento durante a sua realização, sem qualquer prejuízo para os voluntários e suas famílias. Finalmente, fui informado(a) que as informações sobre meu(minha) filho(a) e a sua participação no estudo serão mantidas em sigilo.

Considero-me satisfeito(a) com as explicações fornecidas e concordo que meu(minha) filho(a) menor de idade participe como voluntário(a) deste estudo.

Acrelândia, _____ de _____ de 2013.

Nome: _____

Assinatura: _____

Marcelo Urbano Ferreira ou Pablo Secato Fontoura

(Documento em duas vias, 01 para o voluntário, 01 para o pesquisador)

Endereço para contato:

Unidade Mista de Saúde de Acrelândia, Av. Paraná s/n, Centro, Acrelândia (AC)

Telefone: (68) 3235-1188, Celular (68) 9984-4921

ANEXO D – QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL (VISITA INICIAL)

Projeto: Investigação de reservatórios para malária residual por Plasmodium vivax em área rural da Amazônia

FICHA INDIVIDUAL (visita do dia 0)

DATA: ____/____/____

A. DADOS PESSOAIS

ID: _____ Nome: _____ Apelido: _____

Dom: _____ Ramal: _____ Localidade: _____

Data Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ anos (____ meses, se < 2 anos)

Local de Nasc.: _____ Sexo: () M () F

Nome da mãe: _____

Entrevistador: _____

Tempo que mora na Amazônia? ____ anos ____ meses

Tempo que mora na localidade? ____ anos ____ meses

Tempo nessa casa? ____ anos ____ meses

B. HISTÓRICO DE MIGRAÇÃO

Antes de vir para esta localidade, onde o Sr.(a) morava? (Informações sobre até 4 localidades de residência antes da atual)

	1	2	3	4
Nome da localidade				
Município da localidade				
Estado da localidade				
Ano em que saiu da localidade				
Localidade era campo ou cidade				
Tempo de residência na localidade				

C. HÁBITOS/ATIVIDADES

Pesca/caça na beira do rio? () sim () não

Dorme na beira do rio? () sim () não

Atividade na mata entre 18h e 6h? () sim () não () de vez em quando () todo dia.

Qual atividade? _____

Dias de permanência por mês na comunidade: _____

Deslocamento nos últimos:

15 dias: _____

30 dias: _____

Projeto: Investigação de reservatórios para malária residual por *Plasmodium vivax* em área rural da Amazônia

D. MALÁRIA PRÉVIA

Você já teve malária (diagnóstico da FUNASA)? () Sim. Quantas: _____ () Não () Não se lembra/sabe

Já teve malária vivax? () Sim () Não () Não se lembra/não sabe

Já teve malária falciparum? () Sim () Não () Não se lembra/não sabe

Última malária há _____ Espécie: _____

E. DADOS CLÍNICOS

Peso 1: _____ kg Peso 2: _____ kg

Sintomas no último mês

Teve sintomas nos últimos 30 dias? () sim () não Teve sintomas nos últimos 7 dias? () sim () não

Início dos sintomas: _____ Parou há quantos dias: _____

(Intensidade deve ser classificada pelo próprio paciente em fraca (leve), mais ou menos (moderada) ou forte (intensa))

Sintomas apresentados nos últimos 30 dias				Sintomas apresentados nos últimos 7 dias			
Febre	() leve	() moderado	() intenso	Febre	() leve	() moderado	() intenso
Calafrios	() leve	() moderado	() intenso	Calafrios	() leve	() moderado	() intenso
Sudorese	() leve	() moderado	() intenso	Sudorese	() leve	() moderado	() intenso
Fraqueza	() leve	() moderado	() intenso	Fraqueza	() leve	() moderado	() intenso
Cefaléia	() leve	() moderado	() intenso	Cefaléia	() leve	() moderado	() intenso
Perda do apetite	() leve	() moderado	() intenso	Perda do apetite	() leve	() moderado	() intenso
Dor abdominal	() leve	() moderado	() intenso	Dor abdominal	() leve	() moderado	() intenso
Dor em hipocôndrios	() leve	() moderado	() intenso	Dor em hipocôndrios	() leve	() moderado	() intenso
Náuseas	() leve	() moderado	() intenso	Náuseas	() leve	() moderado	() intenso
Vômitos	() leve	() moderado	() intenso	Vômitos	() leve	() moderado	() intenso
Mialgia	() leve	() moderado	() intenso	Mialgia	() leve	() moderado	() intenso
Artralgia	() leve	() moderado	() intenso	Artralgia	() leve	() moderado	() intenso
Lombalgia	() leve	() moderado	() intenso	Lombalgia	() leve	() moderado	() intenso
Diarréia	() leve	() moderado	() intenso	Diarréia	() leve	() moderado	() intenso
Tontura	() leve	() moderado	() intenso	Tontura	() leve	() moderado	() intenso
Outro sintoma	() leve	() moderado	() intenso	Outro sintoma	() leve	() moderado	() intenso
Qual?				Qual?			

Em que ordem os sintomas apareceram? (qual e quais apareceram primeiro?) _____

Usou antimalárico nos últimos 30 dias? () sim () não . Se sim, qual? _____

F. EXAME LABORATORIAL

Material coletado: _____

Gota espessa: () sim () não Data: ____/____/____ Resultado: _____

PCR: () sim () não Data: ____/____/____ Resultado: _____

Hb: () sim () não Data: ____/____/____ Resultado: _____

Outros: _____

ANEXO E – QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL (SEGUIMENTOS)

*Projeto: Investigação de reservatórios para malária residual por *Plasmodium vivax* em área rural da Amazônia*

FICHA INDIVIDUAL DE ACOMPANHAMENTO DATA: ____/____/____

A. DADOS PESSOAIS

ID: _____ Nome: _____ Apelido: _____

Dom: _____ Ramal: _____ Localidade: _____

Entrevistador: _____

Visita: () dia 30 () dia 60 () dia 180

Deslocamentos desde a última visita (____/____/____)

Mês	Dias fora da área	Localidade	Nota

B. MALÁRIA DESDE A ÚLTIMA VISITA

(Se o indivíduo teve malária no período entre a última visita e agora)

Dia/Mês	Espécie	Parasitemia	Tratamento
____/____	_____	_____	_____
____/____	_____	_____	_____
____/____	_____	_____	_____
____/____	_____	_____	_____

ANEXO F – ARTIGO: REACTIVE CASE DETECTION FOR *PLASMODIUM VIVAX* MALARIA ELIMINATION IN RURAL AMAZONIA

RESEARCH ARTICLE

Reactive Case Detection for *Plasmodium vivax* Malaria Elimination in Rural Amazonia

Pablo S. Fontoura¹, Bruna F. Finco¹, Nathália F. Lima¹, Jaques F. de Carvalho, Jr.¹, Joseph M. Vinetz^{2,3}, Márcia C. Castro⁴, Marcelo U. Ferreira¹✉

1 Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **2** Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, University of California San Diego, La Jolla, CA, United States of America, **3** Alexander von Humboldt Institute of Tropical Medicine and Faculty of Sciences, Department of Cellular and Molecular Sciences, Laboratory of Research and Development, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru, **4** Department of Global Health and Population, Harvard T. H. Chan School of Public Health, Boston, MA, United States of America

✉ These authors contributed equally to this work.
✉ muferr@usp.br

Abstract

OPEN ACCESS

Citation: Fontoura PS, Finco BF, Lima NF, de Carvalho JF, Jr., Vinetz JM, Castro MC, et al. (2016) Reactive Case Detection for *Plasmodium vivax* Malaria Elimination in Rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis* 10(12): e0005221. doi:10.1371/journal.pntd.0005221

Editor: Photini Simnis, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, UNITED STATES

Received: October 13, 2016

Accepted: December 1, 2016

Published: December 12, 2016

Copyright: © 2016 Fontoura et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files ([S1](#) and [S2](#) Databases).

Funding: This research was supported by research grants from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH), United States of America (<https://www.niaid.nih.gov/>) (U19 AI089681 to JMV), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2013/02764-8 to MUF) (<http://www.fapesp.br/en/>), and the Ministry of Health of Brazil (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/>

Background

Malaria burden in Brazil has reached its lowest levels in 35 years and *Plasmodium vivax* now accounts for 84% of cases countrywide. Targeting residual malaria transmission entrenched in the Amazon is the next major challenge for ongoing elimination efforts. Better strategies are urgently needed to address the vast reservoir of asymptomatic *P. vivax* carriers in this and other areas approaching malaria elimination.

Methods

We evaluated a reactive case detection (RCD) strategy tailored for *P. vivax* transmission in farming settlements in the Amazon Basin of Brazil. Over six months, 41 cases detected by passive surveillance triggered four rounds of RCD (0, 30, 60, and 180 days after index case enrollment), using microscopy- and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)-based diagnosis, comprising subjects sharing the household (HH) with the index case ($n = 163$), those living in the 5 nearest HHs within 3 km ($n = 878$), and individuals from 5 randomly chosen control HHs located > 5 km away from index cases ($n = 841$). Correlates of infection were identified with mixed-effects logistic regression models. Molecular genotyping was used to infer local parasite transmission networks.

Principal findings/Conclusions

Subjects in index and neighbor HHs were significantly more likely to be parasitemic than control HH members, after adjusting for potential confounders, and together harbored $> 90\%$ of the *P. vivax* biomass in study subjects. Clustering patterns were temporally stable. Four rounds of microscopy-based RCD would identify only 49.5% of the infections diagnosed by qPCR, but 76.8% of the total parasite biomass circulating in the proximity of index HHs. However, control HHs accounted for 27.6% of qPCR-positive samples, 92.6% of them

o-ministerio/principal/secretarias/svs (796673/2013 to MUF). NPL (2013/26928-0) and MCC (2013/17259-7) were supported by FAPESP; PSF is supported by a scholarship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) of Brazil (<http://cnpq.br>), which also provides a senior researcher scholarship to MUF. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

from asymptomatic carriers beyond the reach of RCD. Molecular genotyping revealed high *P. vivax* diversity, consistent with complex transmission networks and multiple sources of infection within clusters, potentially complicating malaria elimination efforts.

Author Summary

Addressing the vast reservoir of asymptomatic *Plasmodium vivax* carriers clustered in hard-to-reach rural communities is a major challenge faced by countries approaching malaria elimination across Latin America and Asia. Routine surveillance targets subjects presenting with fever or reporting recent fever, but overlooks asymptomatic infections that might be otherwise detected by periodic mass blood surveys of the entire population at risk. Here we show that subjects living in close proximity to malaria cases detected by routine passive surveillance are much more likely to carry both symptomatic and asymptomatic infections than randomly selected inhabitants in the same farming settlements in the Amazon Basin of Brazil. Four rounds of microscopy-based screening for malaria parasites targeted at these high-risk subjects would identify 49.5% of the parasite carriers (who together harbored 76.8% of the total *P. vivax* biomass circulating in the proximity of index cases) detected by a more sensitive molecular method. Whether subpatent and asymptomatic carriers outside the identified clusters of symptomatic infections, beyond the reach of our screening, represent a significant parasite reservoir remains undetermined. The extensive genetic diversity found in local *P. vivax* populations suggests that multiple sources of infection fuel ongoing residual transmission within malaria clusters, further complicating current elimination efforts.

Introduction

Over one-third of the world's population is currently at risk of infection with *Plasmodium vivax*, the human malaria parasite with the widest global distribution [1]. Where both species coexist, *P. vivax* typically causes less severe cases and deaths than *P. falciparum*, but its distinctive biological features pose major challenges for malaria elimination strategies focused on early diagnosis and prompt treatment of blood-stage infections. First, low-density *P. vivax* infections, which are often subpatent (i.e., missed by conventional microscopy) and asymptomatic, predominate in areas approaching malaria elimination, rendering accurate clinical and laboratory diagnosis more difficult [2]. Accordingly, 54% of the *P. vivax* infections detected by polymerase chain reaction (PCR) in a rural Amazonian cohort were missed by microscopy; 57% of them caused no clinical signs or symptoms suggestive of malaria and 33% were both subpatent and asymptomatic [3]. Second, *P. vivax* remains silent within human hosts for several months as hypnozoites, the dormant liver stages that may eventually cause relapses [4]. Finally, compared to other human malaria parasites, *P. vivax* transmission is favored by the earlier production within human hosts of blood stages that are infective to mosquito vectors (mature gametocytes) as well as by the faster development within vectors of stages that are infective to humans (sporozoites) [5].

Brazil is one of the 14 (out of 21) malaria-endemic countries in the region of the Americas that achieved a $\geq 75\%$ reduction in their case incidence rates between 2000 and 2015, as called for by the United Nations' Millennium Development Goals [6]. This country currently contributes 37% of the regional malaria burden, with 142,314 microscopically confirmed cases in 2015

(<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>). Most transmission hotspots are located in remote sites across the Amazon Basin. This vast region, with 60% of the country's territory but only 13% of its total population, accounts for 99.5% of all malaria cases diagnosed in Brazil; 84% of them are due to *P. vivax* [7].

Eliminating residual foci when malaria is steadily declining and reaching pre-elimination stages is the next major challenge in Brazil [7]. Routine surveillance targets subjects presenting with fever or with a history of recent fever or other malaria-related symptoms and signs, who are screened for malaria parasites by microscopy or rapid diagnostic tests (RDT) followed by antimalarial treatment if found to be infected [8]. Accordingly, nearly 60% of all infections in Brazil are laboratory-confirmed within 48 hours after the onset of symptoms, preventing severe morbidity [7]. However, this strategy overlooks asymptomatic infections that might be otherwise detected by periodic cross-sectional surveys of the entire population at risk [9]. As malaria transmission declines, large populations must be screened to diagnose relatively few asymptomatic carriers, and diagnostic techniques available for large-scale use, such as microscopy and RDT, are not sensitive enough to detect low-grade infections that are typical of residual malaria settings [10].

Here, we evaluate a reactive case detection (RCD) strategy [11] that has been tailored for rural Amazonian communities with low *P. vivax* endemicity and substantial spatial clustering of malaria episodes [12,13]. We sought to test three hypotheses: (a) individuals living in close proximity to malaria cases diagnosed by routine surveillance (index cases) are more likely to carry malaria parasites (including subpatent and asymptomatic infections) than randomly selected inhabitants living in the same area; (b) the increased risk of infection in the proximity of index cases persists over the next few months, due to the relapsing nature of *P. vivax*; and (c) molecular genotyping of parasites may help to determine the epidemiological connections among cases found by RCD.

Methods

Study area

Acrelândia is a municipality situated in the easternmost corner of Acre State, Amazon Basin of Brazil, bordering with the States of Amazonas and Rondônia (S1 Fig). The municipality covers a territory of 1,808 km² between the Abunã and Iquiri Rivers, in the Acre River Valley, with a population of 14,120 inhabitants. Nearly half of them live in the town of Acrelândia (9° 49' 40" S, 66° 52' 58" W), located 35 km northeast of Plácido de Castro (the nearest urban center, on the border with Bolivia) and 112 km east of Rio Branco (capital city of Acre). With its equatorial humid climate, this area receives the most rainfall (annual average, 2,198.5 mm) between December and March. The mean annual temperature is 24.5°C. Subsistence agriculture and cattle raising are the main economic activities, with coffee, bananas, and rice being the predominant cash crops.

Acrelândia has experienced a major decline in malaria incidence in recent years [14], but year-round residual malaria transmission persists in farming settlements surrounding the town, with 163 slide-confirmed cases in 2009, 248 in 2010, 104 in 2011 and 79 in 2012 (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>). Although both *P. falciparum* and *P. vivax* were transmitted in the early 2000s, with the latter accounting for over 80% of all infections [14], only *P. vivax* has been observed in slide-confirmed indigenous cases since 2010. Selective indoor spraying with residual insecticides, implemented in early 2008, and the widespread distribution of long-lasting insecticide-treated bed nets, since 2010, are likely to have contributed to the dramatic reduction of

malaria transmission (with the virtual elimination of *P. falciparum*) in Acrelândia in recent years. The main local vector is the highly anthropophilic and exophilic *Anopheles darlingi* [15], but *An. benarrochi* s.l., *An. oswaldoi* s.l., and *An. konderi* s.l. are also often found in larval habitats [16].

Study design and population

The study design is summarized in Fig 1. Briefly, the RCD strategy was triggered whenever an eligible malaria case was detected by routine passive surveillance ("index case"); subjects who shared the household (HH) with the index case ("index HH" members) and their neighbors within a defined radius ("neighbor HH" members) were screened for malaria parasites in search of secondary infections. We also enrolled randomly chosen subjects in "control HHs" located beyond a 5-km radius from index HHs, but in the same or nearby locality, to serve as controls putatively unexposed to secondary infections originating from the vicinity of index cases.

The vast majority of the 1,923 study participants were enrolled between January and July 2013, except for those who were later recruited to replace individuals leaving the site before study completion (see below). Inclusion criteria were: (a) all subjects aged ≥ 3 months living in

Fig 1. Schematic representation of the study design. For each index case detected by routine passive surveillance and enrolled in the study we invited the following individuals to participate: (a) all subjects who shared the household (HH) with the index case (index HH, represented in red), (b) all members of the five nearest neighbors within a radius of 3 km from the index HH (neighbor HHs, represented in orange), and (c) randomly chosen subjects living in five control HHs > 5 km away from the index HH but still in the same or nearby locality (control HHs, represented in black). Four visits were made to each HH, the first at the time of index case diagnosis (day 0) and the following 30, 60, and 180 days later.

doi:10.1371/journal.pntd.0005221.g001

the selected HHs who provided written informed consent, or with parental written informed consent and assent when age-appropriate; and (b) subjects with plans to remain in the study site for the next six months. Exclusion criteria included mental disorders and any chronic or acute condition that, in the opinion of the field nurse, might affect the results of the study or the subjects' ability of understanding the study objectives and of providing informed consent. Participants were classified into the following categories: (a) 41 index cases—had a *P. vivax* infection diagnosed by routine surveillance during the enrollment period and were recruited in one of the two only government-run malaria clinics currently operating in Acrelândia (one in the urban area and one on the BR 364 highway, next to the border with the State of Rondônia; no other public or private facilities provide malaria diagnosis and treatment in this area); (b) 163 index HH members—subjects who shared the HH with the index case; (c) 878 neighbor HH members—subjects living in the five nearest houses, within a radius of up to 3 km (average, 731 m) away from the index HH (neighbor HH members); (d) 841 control HH members—subjects living in five randomly chosen houses located in the same or nearby locality but > 5 km (average, 12 km) away from the index HH. The 5-km radius was chosen based on the maximal flight range reported for *An. darlingi* in the Amazon [17] to ensure that control subjects are unlikely to share common sources of infection with index cases and their neighbors.

Home visits were made to eligible subjects on day 0 (at enrollment, within 48 hrs of the index case diagnosis) and 30 (± 5), 60 (± 5), and 180 (± 10) days after the first visit, with a total of 6,172 observations. Visits were scheduled to maximize the probability of finding infections that had been acquired at the same time as the index case (day 0), those that were secondary to the index case or other infections diagnosed at baseline (day 30), new infections originating from these secondary infections (day 60), as well as most relapses, which are usually recorded in local strains of *P. vivax* up to 180 days after the primary infection [18]. In every visit, subjects were interviewed by our field team, consisting of two biologists and a nurse, and invited to provide a 5-mL venous blood sample (index cases) or finger-prick blood sample (all other study participants) for malaria diagnosis by both thick-smear microscopy and quantitative real-time PCR (qPCR), regardless of any clinical symptoms (S1 Fig). During home visits, 6,028 blood samples were collected, with only 144 (2.4%) refusals. Neighbor or control HH members who left the study site over the six-month study period ($n = 151$) were replaced with their nearest neighbors available.

Laboratory methods

Laboratory diagnosis of malaria was based on microscopic examination of thick smears and qPCR. A total of 6,028 thick blood smears were stained with Giemsa and examined for malaria parasites under $1000\times$ magnification in our laboratory in the town of Acrelândia. At least 100 fields (corresponding to approximately 0.3 μ L of blood) were examined before a slide was declared negative. We additionally used qPCR to detect and quantify *P. vivax* parasitemia on 5,969 clinical samples. To this end, we isolated DNA templates using Qiagen (Hilden, Germany) kits. We used QIAamp DNA blood kits for 200- μ L venous blood samples and QIAamp DNA micro kits for 5- μ L capillary blood samples eluted from three 3-mm bloodspots excised from FTA Micro Cards (Whatman, Clifton, NJ). Final DNA elution volumes were 20 μ L for bloodspots and 200 μ L for whole blood. Each 20 μ L qPCR mixture contained 2 μ L of template DNA (corresponding to approximately 2 μ L of venous blood or 0.5 μ L of finger-prick blood), 10 μ L of 2 $\times$ Maxima SYBR Green qPCR master mixture (Fermentas, Burlington, Canada) and 0.5 μ M of each of the primers P1 (ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT) and V1 (CAA TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A) [19], which allow the amplification of a 100-base pair (bp) fragment of the *P. vivax* 18S rRNA gene. Standard curves were prepared with serial tenfold

dilutions of the target sequence, cloned into pGEM-T Easy vectors (Promega, Madison, WI), to allow for parasite load quantitation (number of parasites/ μ L of blood). We used a Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) for PCR amplification with a template denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 minute at 60°C, with fluorescence acquisition at the end of each extension step. Amplification was followed by a melting program consisting of 15 sec at 95°C, 15 sec at 60°C, and a stepwise temperature increase of 0.2°C/sec until 95°C, with fluorescence acquisition at each temperature transition. The detection threshold of this diagnostic qPCR is approximately 3.3 parasites/ μ L of blood. No-template controls (containing all reagents for amplification except for the DNA template) were run for every qPCR microplate. To estimate the relative contribution of particular subgroups of infected individuals to the total *P. vivax* biomass found in the study population, we summed up all individual qPCR-derived *P. vivax* densities and calculated the fraction corresponding to each subgroup. Because parasite densities are expressed as parasites per blood volume, we assumed that average whole-body blood volumes (volemias) do not differ across subgroups.

Parasite genotyping was carried out on microscopy- and qPCR-positive samples to classify infections as either (a) recrudescences, homologous relapses or persisting untreated infections (identical multilocus genotype reappearing in repeated infections in the same subject), (b) related infections in different subjects (identical or similar genotypes appearing in different subjects either in the same or consecutive RCD rounds, suggestive of local—within cluster—transmission) or (c) unrelated, sporadic infections or heterologous relapses (different genotypes), as described in Fig 2. Note that relapses may originate from reactivation of either the same parasite clone found in the primary bloodstream infection (homologous hypnozoites) or another, genetically different clone (heterologous hypnozoites) [20,21]. We used nested PCR [22] to genotype three highly polymorphic single-copy markers: one variable domain of the merozoite surface protein-1 gene (*msp*1F3 [23]) and two microsatellite DNA markers, *Pv*3.27 [24] and *MS16* [25]. PCR products were analyzed by capillary electrophoresis on an automated DNA sequencer ABI 3500 (Applied Biosystems), and their lengths (in bp) and relative abundance (peak heights in electropherograms) were determined using the commercially available GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems) software. DNA samples from 361 laboratory-confirmed *P. vivax* infections diagnosed during the study (66 from index cases and 295 from other study participants) were tested; 343 (95.0%) of them were successfully genotyped at all 3 loci. The minimal detectable peak height was set to 200 arbitrary fluorescence units. Because stutter bands may be occasionally observed in microsatellite genotyping, we scored two alleles at a locus only when the minor peak was > 33% the height of the predominant peak. Only two samples, out of 343 that were fully genotyped, had minor alleles with peaks of > 200 fluorescence units that were discarded (one in each sample) because they failed to reach one-third of the height of the major peak in the same sample. Samples were considered to contain multiple clones if at least one locus showed more than one allele. Multilocus genotypes were defined as unique combinations of alleles at each locus analyzed. Although our descriptive analysis considered the most abundant allele (as judged by peak heights) at each locus for assigning predominant genotypes to multiple-clone infections, we also considered all possible genotypes in pairwise comparisons of samples from the same subjects (recurring infections) or within the same cluster (comprising the index and neighbor HHs). For this purpose, we listed all combinations of alleles, considering major and minor peaks, in each pair. Samples were considered to harbor *identical* parasites when they had exactly the same predominant (or only) genotype; they were considered to harbor *similar* parasites when the same alleles (considering major and minor peaks) were found at all loci, but their predominant genotypes were different.

Fig 2. Inferring transmission pathways of *Plasmodium vivax* genotypes within malaria clusters. Circles represent individual study subjects carrying identical parasite genotypes; red and orange circles represent index and neighbor or household (HH) members, respectively. Infections B1 and C, both diagnosed on day 0, have a common source (A) that had not been included in the study. D is a secondary infection with known source within the cluster (namely, B1). B2 and B3 have been diagnosed in the same subject as B1, 30 and 180 days later. If B1 was treated with chloroquine-primaquine (as all microscopy-positive infections were in our study), B2 may be either a recrudescence (due to chloroquine failure) or an early homologous relapse (due to primaquine failure to clear liver-stage hypnozoites); if B1 was missed by onsite microscopy and left untreated during our study, B2 may also represent a chronic, untreated blood-stage infection. B3 may represent either a chronic untreated infection (if B1 and B2 were left untreated) or a late homologous relapse (if chloroquine has successfully cleared blood-stage parasites but primaquine failed to clear hypnozoites).

doi:10.1371/journal.pntd.0005221.g002

Clinical definitions and treatment

A laboratory-confirmed *P. vivax* infection was defined as any episode of parasitemia detected by thick-smear microscopy, qPCR, or both. Subpatent infections were defined as infections confirmed by qPCR but missed by microscopy. We defined symptomatic malaria as a laboratory-confirmed infection, irrespective of the parasite density, diagnosed in a subject reporting one or more signs and symptoms investigated (fever, headache, arthralgia, myalgia, and lower back pain), up to seven days before the interview. Subjects with laboratory-confirmed infections, irrespective of the parasite density, but no malaria-related signs or symptoms up to seven days prior to the interview, were classified as asymptomatic parasite carriers. All study participants with vivax malaria infection confirmed by onsite microscopy, either symptomatic or not, received free-of-charge treatment with chloroquine (total dose, 25 mg of base/kg over 3 days) and primaquine (0.5 mg of base/kg/day for 7 days) following the latest antimalarial therapy guidelines of the Ministry of Health of Brazil [26]. According to these guidelines, infections in microscopy-negative subjects that were later detected by qPCR were not routinely treated.

Statistical analysis

Data were entered and cleaned using EpiInfo version 3.5.2 software (Center for Diseases Control and Prevention, Atlanta, GA) and analyzed with STATA version 14.1 software (Stata, College Station, TX). Proportions were compared by applying standard χ^2 of Fisher exact tests to contingency tables. Statistical significance was defined at the 5% level (two-tailed tests) and 95% confidence intervals (CI) were estimated whenever appropriate.

Regression models were run to identify correlates of *P. vivax* infection in one or more RCD rounds, regardless of any symptoms, stratified by diagnostic method: microscopy ($n = 5,866$ complete observations) and qPCR ($n = 5,807$ complete observations) in one or more RCD rounds, regardless of any symptoms. Index cases were excluded from this analysis. Individual-level variables included in the model were: age, gender, occupation, past migratory history, travel history during the last month, overnight stays in the forest in the last month (for hunting or fishing), use of vector control measures such as bed nets, history of slide-confirmed *P. vivax* malaria within the past six months, history of malaria-related symptoms and signs within the previous week, and use of antimalarials within the past month. HH-level variables were: HH location, determined with the use of global positioning system (GPS) receivers, and HH size. [S1 Database](#), provided as supplementary material online, has the variables included in the logistic regression models.

Due to the nested structure of the data, which introduces dependency among observations that can affect model parameter estimates, we used the "melogit" STATA command to build mixed-effects logistic regression models that included the grouping variables as random factors. We had repeated observations (on days 0, 30, 60, and 180; grouping variable, "round") nested within subjects (grouping variable, "individual") who were clustered within HHs (grouping variable, "household"). Finally, HHs were clustered within index cases (grouping variable, "index case"), since the inclusion of each index case triggered the recruitment of matched study participants (other members of the index HHs, neighbor HHs, and control HHs; [Fig 1](#)). Covariates were introduced in the models in a stepwise forward approach, and only those that were associated with the outcome at a significance level of at least 20% were retained in the final model. Cases with missing information were excluded. In addition, we fitted mixed-effects Poisson regression models to the data, but the random-effects variances associated with the estimates were substantially higher than those obtained with the logistic models described above. Thus, here we only present results derived from the logistic regression analysis.

As required for all observational studies published by *PLoS Neglected Tropical Diseases*, this article includes the STROBE (STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology) checklist to document its compliance with STROBE guidelines ([S1 Checklist](#)).

Ethics statement

Study protocols were approved by the Institutional Review Board of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (approval number, 228.720). Written informed consent was obtained from all study participants or their parents/guardians.

Results

Subject characteristics

The study population comprised 1,923 subjects (13.6% of the total population of Acrelândia), who were aged between 3 months and 89 years (mean, 26.5 years) and had been living in the study site for 1 month to 64 years (mean, 9 years). Most (1,037 or 53.9%) were males and 1,613 (83.9%) were born in the Amazon. Nearly half of them reported previous slide-confirmed malaria episodes, but <5% had a *P. vivax* infection within the past six months. Eighteen percent reported overnight stays in the forest in the last month. Study participants were distributed into seven localities of the municipality of Acrelândia: Gleba Porto Luiz (PTL), Projeto Santo Antônio Peixoto (SAP), Projeto São João do Balanço (SJB), Projeto Redenção (RED), Projeto Orion (ORI), Reserva Porto Dias (PTD), and Projeto Pedro Peixoto (PEP). Individual HH locations are shown in [Fig 3](#). The 41 index cases corresponded to 21.9% of all *P. vivax* infections diagnosed in Acrelândia between January and July 2013; between 19 (March) and 98 (July) cases were diagnosed monthly during the study period. Index cases were tentatively classified as indigenous, relapsing, or imported according to classical eradication-era criteria [27]; 6 were considered imported (cases that could be traced to a locality outside the study site), 11 were putative relapses (cases diagnosed in subjects with a history of *P. vivax* infection within the past six months), and 24 were considered indigenous (cases that were locally acquired or autochthonous). Index cases, other index HH members and neighbor HH members were recruited in all localities listed above, except for PEP; 22 (53.6%) index cases lived in PTL.

Microscopy positivity rates in RCD rounds

A total of 108 infections were diagnosed by microscopy by our field team over the entire study period. *Plasmodium vivax* positivity rates differed significantly across HH types ([Table 1](#)). They were relatively high (range, 4.1–8.2%) in index HHs (35 positive slides, 6.1%, among 577 examined, 12 of them from asymptomatic subjects; index cases excluded) and much lower (0.0–0.3%) in control HHs (3 positive slides, 0.1%, among 2,586 examined, one of them from an asymptomatic carrier). No slide was positive for *P. falciparum* or *P. malariae*. These results indicate that index HH members are much more likely to carry patent *P. vivax* parasitemias than randomly selected inhabitants living in the same area (control HH members); interestingly, the highest prevalence of infection was observed in index HHs not only at the first visit but also over the following RCD rounds.

Whether RCD strategies should target only index HHs or be extended to neighbor HHs remains a matter of debate. We found widely variable slide positivity rates in neighbor HHs across RCD rounds in our population, ranging from 0.7% (day 0) to 4.4% (day 60) ([Table 1](#)). In the first RCD round, slide-confirmed infections were as rare in neighbor HHs as they were in control HHs (Fisher exact test, $P = 0.220$), suggesting that targeting neighbor HH members on day 0 would not be more effective for diagnosing additional patent infections than randomly screening

Fig 3. Spatial distribution of individual index, neighbor, and control households (HHs) included in the study. HHs were distributed into seven localities of the municipality of Acrelândia (defined by the local malaria control program): Gleba Porto Luiz (PTL), Projeto Santo Antônio Peixoto (SAP), São João do Balanço (SJB), Projeto Redenção (RED), Projeto Orion (ORI), Reserva Porto Dias (PTD), and Projeto Pedro Peixoto (PEP). Note that one index HH, five neighbor HHs, and 29 control HHs are situated outside the territory of Acrelândia (light green area), but still within the catchment area of local health services. The map also shows the nearest municipalities, Plácido de Castro and Rio Branco, the Abunã River, which delimits the border with Bolivia, and the BR 364 interstate highway, which connects the States of Acre, Rondônia, and southern Amazonia to the rest of the country.

doi:10.1371/journal.pntd.0005221.g003

subjects living in the same locality. In contrast, positivity rates in all other RCD rounds were similar between index HHs and neighbor HHs (Fisher exact test, $P > 0.05$ in all comparisons) and significantly higher than those in control HHs (Fisher exact test, $P < 0.001$ in all comparisons), indicating that screening index and neighbor HH members would be similarly effective for diagnosing new infections between days 30 and 180 (Table 1). Overall, 70 slides (2.6%) from neighbor HHs were positive among 2,703 examined. Thirty-two (45.7%) positive slides were from asymptomatic carriers who were likely to be missed by routine malaria surveillance.

qPCR positivity rates in RCD rounds

We next compared *P. vivax* prevalence diagnosed by qPCR in index HHs (excluding the index case), neighbor HHs and control HHs during the four RCD rounds (Table 2). Not surprisingly,

Table 1. Absolute and relative frequency of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium vivax* infections diagnosed by conventional microscopy among members of index, neighbor, and control households (HHs) in four rounds of reactive case detection (RCD) in Acrelândia, Brazil, 2013.

RCD round	Type of infection	Index HHs		Neighbor HHs		Control HHs		P-value ^a
		Number of infections	%	Number of infections	%	Number of infections	%	
1 (Day 0)	Symptomatic	7	4.8%	5	0.7%	0	0.0%	< 0.001
	Asymptomatic	5	3.4%	0	0.0%	1	0.2%	< 0.001
	Total ^b	12	8.2%	5	0.7%	1	0.2%	< 0.001
	No. tested	147		688		634		
2 (Day 30)	Symptomatic	7	4.9%	8	1.2%	0	0.0%	< 0.001
	Asymptomatic	0	0.0%	5	0.8%	0	0.0%	0.05
	Total ^c	7	4.9%	13	2.0%	0	0.0%	< 0.001
	No. tested	143		647		627		
3 (Day 60)	Symptomatic	6	4.3%	15	2.2%	0	0.0%	< 0.001
	Asymptomatic	4	2.8%	15	2.2%	0	0.0%	< 0.001
	Total ^c	10	7.1%	30	4.4%	0	0.0%	< 0.001
	No. tested	141		679		647		
4 (Day 180)	Symptomatic	3	2.0%	10	1.4%	2	0.3%	0.038
	Asymptomatic	3	2.0%	12	1.7%	0	0.0%	0.002
	Total ^c	6	4.1%	22	3.2%	2	0.3%	< 0.001
	No. tested	146		689		678		

^aTwo-tailed *P*-values for χ^2 tests on 3 × 2 contingency tables testing the null hypothesis of similar proportions of positive results across rows.

^bPairwise comparisons of positivity rates across row with Fisher exact test (at 5% significance): index HHs > neighbor and control HHs; neighbor HHs = control HHs.

^cPairwise comparisons of positivity rates across row with Fisher exact test (at 5% significance): index and neighbor HHs > control HHs; index HHs = neighbor HHs.

doi:10.1371/journal.pntd.0005221.t001

qPCR detected more than double the number of infections than microscopy (293 positive samples among 5,807 examined). Overall qPCR positivity rates were 10.6% in index HHs (1.7-fold higher than microscopy), 5.7% in neighbor HHs (2.2-fold higher than microscopy), and 3.2% in control HHs (> 30-fold higher than microscopy). The vast majority (75 or 92.6%) of infections diagnosed by qPCR in control HHs were asymptomatic, consistent with a silent circulation of *P. vivax* in the community that would be entirely missed by RCD.

Significantly different qPCR positivity rates were found across HH types, ranging from 6.8% to 15.0% in index HHs, 5.0% to 7.0% in neighbor HHs, and 0.3 to 5.6% in control HHs (Table 2). On days 0 and 30, positivity rates were significantly higher in index HHs (excluding the index cases) than in neighbor and control HHs (Fisher exact test, $P < 0.001$ in both comparisons) but they were similar when comparing neighbor to control HHs (Fisher exact test, $P > 0.05$ in both comparisons). Therefore, targeting neighbor HHs in search of new infections would not be more effective than randomly sampling community members on days 0 and 30. However, similar infection rates were found in index and neighbor HHs on day 60 (Fisher exact test, $P = 0.231$) and day 180 (Fisher exact test, $P = 0.413$). Furthermore, significantly higher infection rates were detected by qPCR in neighbor than control HHs in the last two RCD rounds (Fisher exact test, $P < 0.001$ in both comparisons).

Household type, parasite density, and asymptomatic carriage

Microscopy diagnosed 1.9-fold and 1.2-fold more symptomatic than asymptomatic infections in index and neighbor HHs, respectively (Table 1), suggesting that many of these additional slide-positive subjects would be eventually detected by routine surveillance of febrile illnesses.

Table 2. Absolute and relative frequency of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium vivax* infections diagnosed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) among members of index, neighbor, and control households (HHs) in four rounds of reactive case detection (RCD) in Acrelândia, Brazil, 2013.

RCD round	Type of infection	Index HHs		Neighbor HHs		Control HHs		P-value ^a
		Number of infections	%	Number of infections	%	Number of infections	%	
1 (Day 0)	Symptomatic	6	4.1%	6	0.9%	2	0.3%	0.001
	Asymptomatic	16	10.9%	31	4.6%	33	5.2%	0.009
	Total ^b	22	15.0%	37	5.5%	35	5.5%	<0.001
	No. tested	147		674		631		
2 (Day 30)	Symptomatic	8	5.6%	9	1.4%	2	0.3%	<0.001
	Asymptomatic	10	7.0%	36	5.6%	33	5.3%	0.721
	Total ^b	18	12.6%	45	7.0%	35	5.6%	0.012
	No. tested	143		645		626		
3 (Day 60)	Symptomatic	4	2.9%	16	2.4%	0	0.0%	<0.001
	Asymptomatic	7	5.0%	19	2.9%	2	0.3%	<0.001
	Total ^c	11	7.9%	35	5.3%	2	0.3%	<0.001
	No. tested	139		660		634		
4 (Day 180)	Symptomatic	4	2.7%	13	1.9%	2	0.3%	0.007
	Asymptomatic	6	4.1%	21	3.1%	7	1.0%	0.012
	Total ^c	10	6.8%	34	5.0%	9	1.3%	<0.001
	No. tested	146		686		676		

^aTwo-tailed *P*-values for χ^2 tests on 3 × 2 contingency tables testing the null hypothesis of similar proportions of positive results across rows.

^bPairwise comparisons of positivity rates across row with Fisher exact test (at 5% significance): index HHs > neighbor and control HHs; neighbor HHs = control HHs.

^cPairwise comparisons of positivity rates across row with Fisher exact test (at 5% significance): index and neighbor HHs > control HHs; index HHs = neighbor HHs.

doi:10.1371/journal.pntd.0005221.t002

Conversely, qPCR revealed 1.8-fold and 2.4-fold more asymptomatic than symptomatic infections in index HHs and neighbor HHs, respectively (Table 2). Moreover, 12.5-fold more asymptomatic than symptomatic infections were diagnosed by qPCR in control HHs (Table 2).

We thus sought to estimate the relative contribution of index and neighbor HH members (who would be screened during RCD) and control HH members (who would be missed by RCD) to the total *P. vivax* biomass circulating in the study population. To this end, we used data from 276 qPCR-positive samples with available qPCR-based parasite-density measurements (Fig 4A). Overall, geometric mean parasitemias were twice as low in control HHs (5.6 parasites/μL [95% CI: 4.3–7.5]) as in index HHs (14.9 parasites/μL [95% CI: 8.9–24.7]) and neighbor HHs (11.8 parasites/μL [95% CI: 8.9–16.4]). Only 7.7% of the parasite biomass circulating in study subjects were contributed by control HH members (represented as black bar segments in Fig 4A), who had 27.4% of all qPCR-positive samples. The corresponding fractions harbored by index and neighbor HH members were 29.4% (20.7% of all qPCR-positive samples) and 62.8% (51.9% of all qPCR-positive samples) of the total parasite biomass, respectively.

Individuals with patent infections harbored 80.7% of the *P. vivax* biomass (geometric mean parasitemia, 34.6 parasites/μL [95% CI: 22.2–54.0]), while those that were missed by microscopy but detected by qPCR had much lower parasite densities (geometric mean parasitemia, 5.5 parasites/μL [95% CI: 4.6–6.7]). If conventional microscopy were the only diagnostic method available to identify infections and guide malaria treatment, a large proportion of the parasite biomass carried by index HH members (92.4%) and neighbor HH members (79.2%),

Fig 4. Frequency distribution of *Plasmodium vivax* blood-stage density classes (parasites per μL of blood in log scale). Parasitemias were estimated by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and shown according to household (HH) type (panel A) and presence or absence of malaria-related clinical symptoms and signs (fever, headache, arthralgia, myalgia, and lower back pain) (panel B). The color code in panel A is the same as in Fig 1 to indicate index HHs, neighbor HHs, and control HHs.

doi:10.1371/journal.pntd.0005221.g004

but only 47.9% of that harbored by control HH members, would be detected and potentially removed by an effective antimalarial chemotherapy.

Parasite densities had a unimodal right-skewed frequency distribution in asymptomatic carriers (blue bar segments in Fig 4B); 65.6% of them were below 10 parasites/ μL , with a geometric mean of 8.6 parasites/ μL (95% CI: 6.8–10.8). Asymptomatic carriers contributed 75.4% of all qPCR-positive samples and 68.3% of the parasite biomass circulating in study subjects. Conversely, symptomatic subjects had a wide range of parasite densities (black bar segments

in Fig 4B), with a nearly flat frequency distribution (geometric mean of 17.4 parasites/ μ L [95% CI: 10.6–28.4]); they contributed 26.1% of all qPCR-positive results and 31.7% of the parasite biomass. We next estimated the parasite biomass fraction that was harbored by control HH members who were asymptomatic, which would be missed by RCD-based strategies. We found that these subjects contributed 24.1% of all qPCR-positive results, but only 4.1% of the total *P. vivax* biomass measured in study subjects.

Correlates of *P. vivax* infection diagnosed by microscopy and qPCR

We used mixed-effects logistic regression analysis to test whether the association between residence in the proximity to an index case and prevalence of *P. vivax* infection remained significant after controlling for potential individual- and HH-level confounders. The fully adjusted model revealed 56.7- and 18.5-times higher odds of slide-confirmed *P. vivax* infection among index and neighbor HH members, respectively, compared to control HH members (Table 3). Similarly, although with smaller magnitude than microscopy, the odds of qPCR-detected infection were significantly higher in index (OR = 3.40) and neighbor HH members (OR = 1.61), compared to control HH members (Table 3). Each additional year of residence in the area was associated with a 4% reduction (95% CI, 1–8%) in the risk of positivity by microscopy ($P = 0.030$) in the fully adjusted logistic model, thus regardless of the HH type. Interestingly, a history of slide-confirmed *P. vivax* infection within the past six months, in the fully adjusted model, was the only other variable significantly associated with increased risk of current infection detected by either microscopy (OR = 5.42; 95% CI: 3.36–8.75, $P < 0.001$) or qPCR (OR = 5.02; 95% CI: 2.77–9.09, $P < 0.001$). These findings suggest that selectively targeting individuals reporting recent *P. vivax* infections, regardless of their proximity to an index case, might be a practical way of finding current infections.

Plasmodium vivax transmission networks around index cases

We used molecular genotyping data (S2 Database) to explore the epidemiological connections among infections diagnosed during the study. We found a high genetic diversity in local *P.*

Table 3. Mixed-effects logistic regression analysis of the association between household (HH) type and risk of *Plasmodium vivax* infection diagnosed by microscopy or quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) in Acrelândia, Brazil, 2013.

Diagnostic method	Regression model	Index HHs vs. Control HHs			Neighbor HHs vs. Control HHs		
		OR ^a	(95% CI) ^b	P-value	OR ^a	(95% CI) ^b	P-value
Microscopy ^c	Univariate	140.30	(30.8–639.7)	<0.001	30.00	(7.9–113.9)	<0.001
	Model 1 ^d	141.90	(32.4–620.9)	<0.001	29.80	(8.1–110.6)	<0.001
	Model 2 ^e	56.70	(13.9–231.1)	<0.001	18.50	(5.25–65.5)	<0.001
qPCR ^d	Univariate	5.67	(3.0–10.7)	<0.001	1.93	(1.3–3.0)	0.003
	Model 1 ^d	5.95	(3.2–11.2)	<0.001	1.95	(1.3–3.0)	0.002
	Model 2 ^e	3.40	(1.8–6.3)	<0.001	1.61	(1.1–6.3)	0.026

^aOR = odds ratio.

^bCI = confidence interval.

^cTotal of 5,866 observations across four rounds of reactive case detection.

^dTotal of 5,807 observations across four rounds of reactive case detection.

^eAdjusted for age (continuous variable in years), gender, and HH size (<3, 3–5, >5 individuals). Likelihood-ratio test (univariate vs. Model 1), $LR = 7.83$ ($P = 0.098$) for microscopy, and $LR = 4.39$ ($P = 0.356$) for qPCR.

^fAdjusted for all variables included on model 1 plus time of residence in the area (in years), overnight stay in the forest (yes vs. no), and history of slide-confirmed *P. vivax* infection within the past six months (yes vs. no). Likelihood-ratio test (Model 1 vs. Model 2), $LR = 34.20$ ($P < 0.001$) for microscopy, and $LR = 50.61$ ($P < 0.001$) for qPCR.

doi:10.1371/journal.pntd.0005221.t003

vivax populations, with 146 unique (predominant or only) genotypes found in 343 completely typed samples (267 from index and neighbor HHs and 76 from control HHs). Most (272 or 79.3%) subjects harbored mixtures of genotypes. Overall, six common genotypes accounted for 30.1% of all infections and were widely distributed across study localities (Table 4). The most common genotype (#81) was recovered from 54 (15.7%) study subjects living in all seven localities, being particularly prevalent (26.1% of all samples) in PTL. Moreover, we found no clear temporal clustering of the six most common genotypes; genotype #81 was recovered from samples collected year-round (S3 Fig).

We next examined parasite genotypes within the 41 clusters surrounding index cases, each comprising one index HH and five neighbor HHs (see Fig 1). Between 1 and 21 (mean, 6.5) *P. vivax* infections were successfully genotyped per cluster during the four RCD rounds ($n = 267$ genotypes analyzed). Overall, 96 (35.9%) samples had genotypes that were either identical or similar to those found in other parasites within the same cluster, while 171 (64.0%) genotypes were unique (i.e., not shared by parasites within the same cluster). Therefore, nearly two thirds of all infections were genetically unrelated to each other within a putative malaria cluster. However, most (23 or 56.1%) clusters had at least one identical or similar genotype shared by two or more parasite samples.

Fig 5 shows several examples of shared and unique genotypes within cluster #3, located in PTL. Note that two index HH members shared the same genotype (#81) on day 0; one of them (who was not treated on day 0) still harbored this genotype 30 days later, consistent with a persisting blood-stage infection or an early homologous relapse, but acquired a different genotype (#88) detected on day 60. Haplotype #81 reappeared in two unrelated neighbor HH members on days 60 and 180, consistent with onward transmission originating from the index HH. Two instances of similar genotypes were also found in pairwise comparisons including mixed-clone infections; these cases are indicated with similar superscript letters in Fig 5. Finally, unique haplotypes (#3, 10, 77, 82, 88, 120, and 141) were found in seven samples, consistent with sporadic *P. vivax* infections that resulted in no further onward transmission within the cluster.

Examples of identical parasite strains within cluster #4 (also from PTL), suggesting a common source of infection, are shown in Fig 6: genotypes #64 (shared by two members of the same neighbor HH on day 30) and #4 (shared by the index case and another member of the index HH on day 180). The source of infection could not be determined in these cases. Interestingly, genotype #81 (which accounts for over one-fourth of all genotypes from PTL) was

Table 4. Distribution of the six most common *Plasmodium vivax* multilocus genotypes (that together accounted for 30.1% of all local infections) across seven study localities in Acrelândia, Brazil, 2013.

Genotype ^{a,b}	Locality ^a (number of samples completely typed)							All ($n = 343$)
	PTL ($n = 172$)	PTD ($n = 54$)	ORI ($n = 35$)	SJB ($n = 33$)	SAP ($n = 24$)	RED ($n = 21$)	PEP ($n = 4$)	
61	7 (4.1%) ^c	1 (1.9%)	2 (5.7%)	1 (3.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	12 (3.5%)
64	7 (4.1%)	1 (1.9%)	0 (0.0%)	2 (6.1%)	2 (8.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	12 (3.5%)
70	5 (2.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (9.5%)	1 (25.0%)	8 (2.3%)
71	2 (1.2%)	3 (5.5%)	2 (5.7%)	1 (3.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	8 (2.3%)
81	45 (26.1%)	2 (3.7%)	1 (2.9%)	3 (9.1%)	1 (4.2%)	2 (9.5%)	0 (0.0%)	54 (15.8%)
82	7 (4.1%)	0 (0.0%)	1 (2.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.8%)	1 (25%)	10 (2.9%)
Others	99 (57.5%)	47 (87.0%)	29 (82.8%)	26 (78.8%)	21 (87.5%)	16 (76.2%)	1 (25.0%)	239 (69.7%)

^aPTL = Gleba Porto Luiz, PTD = Reserva Porto Dias, ORI = Projeto Orion, SJB = Projeto São João do Balanço (PTL), SAP = Projeto Santo Antônio Peixoto, RED = Projeto Redenção (RED), and PEP = Projeto Pedro Peixoto (PEP). The locations of these areas are shown in Fig 3.

^bWe considered only the predominant genotype found in each sample analyzed (see main text for further details).

^cPercentages across columns were calculated for total number of samples analyzed within each locality

doi:10.1371/journal.pntd.0005221.t004

Fig 5. Shared and unique *Plasmodium vivax* multilocus genotypes within cluster #3 from Gleba Porto Luiz, Acrelândia, Brazil, during four rounds of reactive case detection (days 0, 30, 60, and 180). We used the same color code as in Fig 1 to indicate the index HH (red), neighbor HHs (orange), and control HHs (black). Predominant or only genotypes found in each sample are identified with numerals; those recovered from the index case are underlined. Predominant genotypes shared by ≥ 2 parasite samples within the cluster were circled; for example, two index HH members shared the same predominant genotype (#81) on day 0. Identical superscript letters indicate groups of samples harboring parasite lineages (e.g., parasites recovered on day 60 from the index case—whose major genotype is #53—and one neighbor HH member [whose major genotype is #94] that were considered genetically similar when analyzing both major and minor alleles although not identical (see main text for definition)).

doi:10.1371/journal.pntd.0005221.g005

recovered from the index case (on day 60) and one control HH member (on day 30). The probability of finding genotype #81 in a pair of randomly chosen parasite samples from PTL, given by the squared frequency of this genotype in the local parasite population, is 6.8%.

Fig 6. Shared and unique *Plasmodium vivax* multilocus genotypes within cluster #4 from Gleba Porto Luiz, Acrelândia, Brazil, during four rounds of reactive case detection (days 0, 30, 60, and 180). The index, neighbor, and control HHs are shown in red, orange, and black, respectively; predominant or only genotypes were identified with numerals and those recovered from the index case were underlined. Predominant genotypes shared by ≥ 2 parasite samples within the cluster were circled. Identical superscript letters indicate groups of samples harboring parasite lineages that were considered genetically similar although not identical (see main text for definition).

doi:10.1371/journal.pntd.0005221.g006

Similar genotypes were observed within the cluster as well as between members of index and control HHs (Fig 6).

We next examined all instances of recurrent infections within clusters. A total of 130 genotypes were recovered from 54 individuals who had parasite recurrences (range, 2 to 4) during the study. Genotypes recovered from most (41 or 75.9%) recurrent infections were different from those found in the primary infection, even when considering minor alleles in pairwise comparisons involving multiple-clone infections. These results are consistent with unrelated, sporadic infections or heterologous relapses. However, 11 (20.4%) subjects had one or more episodes of recurrent parasitemia with identical or similar genotypes and two (3.7%) had consecutive infections involving both identical and different genotypes (S1 Table). Overall, we found 17 instances of identical or similar genotype recurrence in these 13 subjects, 30–180 days after the primary infection, which may represent parasite recrudescences (≤ 30 days after the primary infection), homologous relapses after successful clearance of blood-stage parasites, or untreated, chronic blood-stage infections (see Fig 2 for definitions). Five subjects with genotype recurrences had subpatent primary infections that were left untreated, consistent with long-lasting infections being detected over the following RCD rounds (S1 Table).

Fig 7 shows an example of recurrent infection with the same genotype within cluster #9, from PTD. Genotype #37 was first recovered from the index case and one neighbor HH member on day 0 (consistent with a common source of infection; Fig 2). This same neighbor HH member, whose primary infection treated, had recurrent subpatent parasitemia with genotype #37 on days 60 and 180, consistent with homologous parasite relapses.

Only six control HH members presented qPCR-detected parasite recurrences during the study. In all cases, different genotypes were found in the primary and subsequent infection. Although all infections were subpatent and left untreated, we found no example of chronic infection with the same strain reappearing in consecutive visits to control HH members.

Fig 7. Shared and unique *Plasmodium vivax* multilocus genotypes within cluster #9 from Reserva Porto Dias, Acrelândia, Brazil, during four rounds of reactive case detection (days 0, 30, 60, and 180). The index, neighbor, and control HHs are shown in red, orange, and black, respectively; predominant or only genotypes were identified with numerals; the one recovered from the index case was underlined. Genotype #37 (circled) was recovered from four parasite samples, while genotype #75 was shared by an index HH member and a control HH member outside the cluster.

doi:10.1371/journal.pntd.0005221.g007

Discussion

Malaria burden in Brazil has reached its lowest levels in more than three decades. This success led the Ministry of Health to launch, in November 2015, a Plan for Elimination of Malaria in Brazil, in alignment with the new Sustainable Development Agenda of the United Nations aimed to reduce the global number of malaria cases by 90% until 2030, and to eventually eliminate malaria in 35 countries [7]. To this end, operationally feasible strategies that can address the vast parasite reservoir found in residual malaria pockets are urgently needed. In this study, we evaluated a RCD strategy tailored for rural Amazonian communities with low *P. vivax* endemicity and spatial clustering of malaria episodes.

Our results provided further evidence that *P. vivax* infections are strongly clustered at the HH level in rural Amazonia [12,13]. In fact, over 53% of all index HHs are located in a single locality (PTL) in the study site (Fig 3). Such a clustering indicates that RCD programs targeting index HHs may be effective in detecting a large proportion of parasite carriers, many of them asymptomatic, in high-risk HHs. Also, index HH members persisted at increased risk of infection over up to 180 days after the index case diagnosis, suggesting that several rounds of RCD may be required to detect a large proportion of new infections within these clusters. These data suggest that malaria transmission hotspots in the area are stable over time, indicating that their identification may be used to target high-priority HHs for control and elimination. The finding that a history of slide-confirmed malaria within the past six months is a strong predictor of *P. vivax* positivity in all RCD rounds suggests a simple way of identifying high-risk subjects that can be further explored in the design of narrowly focused and intensive active surveillance strategies. In addition, although qPCR detected nearly twice more infections than conventional microscopy in index HHs, subpatent infections contributed only 7.6% of the total *P. vivax* biomass circulating in index HH members. Combined, these findings suggest that a highly sensitive molecular method is not an essential component of RCD programs targeting index HH members. Interestingly, the number of slide-confirmed *P. vivax* infections diagnosed in Acrelândia declined substantially after our study was completed; 117 and 54 *P. vivax* infections (99 and 40 of them classified as autochthonous) were recorded in this municipality in 2014 and 2015, respectively (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>).

Large-scale RCD programs have been either limited to index HHs or extended to other HHs in the vicinity of the index HHs [28,29]. It has been hypothesized that limiting RCD to index HHs is cost-effective in areas where routine malaria surveillance already detects a large proportion of positive HHs; however, actively screening the surrounding HHs for new infections may be required in areas with a low coverage of passive surveillance [30]. Comparisons across studies are limited by the use of different criteria to define and recruit “neighbors” (e.g., predefined radius around index cases vs. predefined number of nearest HHs; all vs. febrile neighbors only) and by the varying biological features (e.g., flight range) of local vectors [27,28].

Here we show that malaria positivity rates among neighbor HH members on day 0, when the index case diagnosis triggered the initial investigation, were not significantly different from those found in randomly selected inhabitants in the same communities. Therefore, targeting neighbor HH members at the time of index case diagnosis did not appear to be more cost-effective than screening randomly chosen individuals for identifying new infections in our rural Amazonian setting. Nevertheless, much higher microscopy positivity rates were found in neighbor HHs, compared to control HHs, over the next months, with a similar trend observed for qPCR-based diagnosis in the last two RCD rounds. Furthermore, nearly two-thirds of the *P. vivax* biomass

harbored by study participants was found in neighbor HH members, highlighting their potential contribution to ongoing malaria transmission in the community. One possible explanation for the increased prevalence of infections in neighbor HH members diagnosed on days 60 and 180 is that at least some of them may be secondary to those diagnosed in index HH members on days 0 and 30. We thus conclude that neighbor HHs must be screened in RCD programs in endemic settings similar to our study site. Defining the appropriate timing for microscopy- or qPCR-based screening is crucial for finding these additional cases in a cost-effective way.

A major limitation of RCD-based strategies is that asymptomatic parasite carriers will be missed if no single symptomatic infection is found in their vicinity. A recent survey in coastal Kenya, for example, has revealed different features of clusters of asymptomatic vs. symptomatic infections, such as the greater temporal stability of the former over > 10 years; these clusters with purely asymptomatic or some symptomatic infections did not necessarily overlap spatially in all localities [31]. qPCR-detected asymptomatic infections in our control HHs, which would be entirely missed by RCD, contributed a small fraction (4.1%) of the total parasite biomass found in study participants. Their infectiousness to local vectors remains unknown; one study described an infection rate of 1.2% after feeding *An. darlingi* with blood from asymptomatic *P. vivax* carriers vs. 22% for the mosquitoes fed with blood from symptomatic carriers [32]. Under the assumption that numbers of circulating *P. vivax* asexual blood-stages and mature gametocytes are positively correlated to each other [33], asymptomatic carriers of low-level parasitemias are expected to have relatively few circulating mature gametocytes and thus contribute relatively little to ongoing malaria transmission at a particular time point. However, they may represent a large number of infective man-days if they remain parasitemic for weeks or months and gametocytemias reach a critical (yet undetermined) density threshold for successful mosquito infection [34,35]. Reassuringly, in our study population we found very few asymptomatic infections persisting over consecutive visits to control HHs, none of them with the same genotype, suggesting that most episodes of asymptomatic carriage were short-lived. Whether periodic mass blood screenings with highly sensitive diagnostic methods would be a cost-effective way of addressing this occult parasite reservoir in malaria elimination programs remains to be determined. Alternatively, molecular diagnostic methods in elimination programs may be carefully targeted at subjects who are found to be at high risk of persistent asymptomatic and subpatent parasitemia (e.g., young adults, forest workers etc.) in sequential surveys of a given population.

Malaria clusters in our study localities were not synonymous with isolated, common-source outbreaks involving one or a few closely related parasite genotypes, as in recently described *P. falciparum* outbreaks in Peru [36] and Panama [37]. To the contrary, we characterized a highly diverse *P. vivax* population in our study site as well as in endemic settings nearby [38–40], with a wide variety of strains co-circulating not only in the proximity of index cases but also in the surrounding HHs outside the clusters. Accordingly, nearly two thirds of the genotypes circulating within each cluster were unique, consistent with a continuous introduction of new parasite strains and little onward transmission of these strains to neighboring individuals over the following months. These results suggest that a substantial proportion of infections are acquired outside the operationally defined malaria clusters; alternatively, human movement may continuously spread parasite genotypes (wherever infections were acquired) beyond the limits of the clusters. In other words, clusters would not represent isolated islands but archipelagos with considerable parasite migration between islands. Moreover, different strains were characterized in three-fourths of parasite recurrences observed in 54 study subjects, suggesting that re-infections or heterologous relapses, rather than recrudescences, homologous relapses, or chronic untreated blood-stage infections, are responsible for most repeated episodes of parasite carriage diagnosed within malaria clusters during the four RCD rounds.

Results shown here may help decision-makers to design malaria elimination strategies in low-endemicity settings where *P. vivax* largely predominates, such as most Latin American countries [41]. We conclude that RCD-based strategies targeting index HH members and their neighbors may be suggested as a major component of malaria elimination efforts in Brazil. Whether the subpatent and asymptomatic carriers who remain outside the identified clusters of symptomatic infections, beyond the reach of RCD programs, may represent a significant parasite reservoir remains to be determined. These silent infections could only be identified by mass blood surveys using highly sensitive diagnostic techniques, whose feasibility and cost-effectivity are currently unknown. Finally, genotyping data have revealed rather complex networks of residual malaria transmission in rural Amazonian communities, consistent with multiple sources of infection, further complicating current elimination efforts.

Supporting Information

S1 Checklist. STROBE (STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology) Checklist. As required for all observational studies published by *PLoS Neglected Tropical Diseases*, this paper includes the STROBE checklist to document its compliance with STROBE guidelines.

(PDF)

S1 Fig. Map showing the location of the study site, the municipality of Acrelândia, in the State of Acre, southwestern part of the Amazon Basin of Brazil. The map also indicates the location of the nearest towns, Acrelândia, Plácido de Castro, Senador Guimard, and Rio Branco (capital of Acre), and the BR 364 interstate highway, which connects the States of Acre, Rondônia, and southern Amazonas to the rest of the country.

(PDF)

S2 Fig. Home visits to study participants in Acrelândia, Brazil, 2013. Photographs by Alessandra Fratus.

(PDF)

S3 Fig. Temporal distribution of the six most common *Plasmodium vivax* multilocus genotypes (that together accounted for 30.1% of all local infections) in study localities in Acrelândia, Brazil, 2013.

(PDF)

S1 Table. Multilocus genotypes in consecutive *Plasmodium vivax* infections diagnosed in 54 study subject during reactive case detection rounds (days 0, 30, 60, and 180) in Acrelândia, Brazil, 2013.

(PDF)

S1 Database. Excel file with all variables used in the logistic regression models.

(XLSX)

S2 Database. Excel file with genotyping data from 343 completely analyzed *P. vivax* infections.

(XLSX)

Acknowledgments

We thank all inhabitants in the study localities in Acrelândia for their enthusiastic participation in this study; Malla R. Rao, Paola B. Marchesini, and Ana Carolina Santelli for helpful comments and suggestions on study design; Cleide F. Nunes for onsite microscopic diagnosis of

malaria; Camilla L. Batista and Carmen S. A. Takata for help with microsatellite typing; Susana Barbosa for help with statistical analysis; Antônio Vasconcelos de Souza, Aquino Gomes, José Ribamar Duarte de Oliveira, Juvenal Arcanjo dos Santos, Clenilton Magno de Souza, and Francisco Naildo C. Leitão for logistic support, and Maria José Menezes for laboratory support.

Author Contributions

Conceptualization: MUF MCC PSF JMV.

Formal analysis: PSF MCC MUF.

Funding acquisition: MUF JMV.

Investigation: PSF BFF NFL JFdC.

Project administration: MUF.

Supervision: MUF MCC.

Writing – original draft: PSF JMV MCC MUF.

Writing – review & editing: PSF JMV MCC MUF.

References

1. World Health Organization (2015) World Malaria Report 2015. Geneva, World Health Organization, 280 pp. Available: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/en/>
2. Cheng Q, Cunningham J, Gatton ML (2015) Systematic review of sub-microscopic *P. vivax* infections: prevalence and determining factors. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e3413. doi: [10.1371/journal.pntd.0003413](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003413) PMID: [25569135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25569135/)
3. Barbosa S, Gozde AB, Lima NF, Batista CL, Bastos MS, et al. (2014) Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* malaria: a case study in rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3109. doi: [10.1371/journal.pntd.0003109](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003109) PMID: [25166263](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25166263/)
4. White NJ, Imwong M (2012) Relapse. *Adv Parasitol* 80: 113–50. doi: [10.1016/B978-0-12-397900-1.00002-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397900-1.00002-5) PMID: [23199487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23199487/)
5. Sattabongkot J, Tsuiji T, Zollner GE, Sirichaisinthop J, Cui L (2004) *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? *Trends Parasitol* 20: 192–8. doi: [10.1016/j.pt.2004.02.001](https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.02.001) PMID: [15099559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15099559/)
6. Pan American Health Organization (2016) Interactive Malaria Statistics. Washington, DC, Pan American Health Organization. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=2632&Itemid=2130
7. Ferreira MU, Castro MC (2016) Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J* 15: 284. doi: [10.1186/s12936-016-1335-1](https://doi.org/10.1186/s12936-016-1335-1) PMID: [27206924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27206924/)
8. World Health Organization (2012) Disease surveillance for malaria elimination. An operational manual. Geneva: World Health Organization, WHO Press. 48 p. Available: http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503334_eng.pdf
9. Sturrock HJ, Hsiang MS, Cohen JM, Smith DL, Greenhouse B, et al. (2013) Targeting asymptomatic malaria infections: active surveillance in control and elimination. *PLoS Med* 10: e1001467. doi: [10.1371/journal.pmed.1001467](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001467) PMID: [23853551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23853551/)
10. Stresman G, Kobayashi T, Kamanga A, Thuma PE, Mharakurwa S, et al. (2012) Malaria research challenges in low prevalence settings. *Malar J* 11: 353. doi: [10.1186/1475-2875-11-353](https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-353) PMID: [23098277](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23098277/)
11. Moonen B, Cohen JM, Snow RW, Slutsker L, Drakeley C, et al. (2010) Operational strategies to achieve and maintain malaria elimination. *Lancet* 376: 1592–603. doi: [10.1016/S0140-6736\(10\)61269-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61269-X) PMID: [21035841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21035841/)
12. Castro MC, Sawyer DO, Singer BH (2007) Spatial patterns of malaria in the Amazon: implications for surveillance and targeted interventions. *Health Place* 13: 368–80. doi: [10.1016/j.healthplace.2006.03.006](https://doi.org/10.1016/j.healthplace.2006.03.006) PMID: [16815074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16815074/)
13. da Silva-Nunes M, Codeço CT, Malafronte RS, da Silva NS, Juncansen C, et al. (2008) Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. *Am J Trop Med Hyg* 79: 624–35. PMID: [18840755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18840755/)

14. da Silva NS, da Silva-Nunes M, Malafrente RS, Menezes MJ, D'Arcadia RR, et al. (2010) Epidemiology and control of frontier malaria in Brazil: lessons from community-based studies in rural Amazonia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 343–50. doi: [10.1016/j.trstmh.2009.12.010](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.12.010) PMID: [20106494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20106494/)
15. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, et al. (2010) The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors* 3: 72. doi: [10.1186/1756-3305-3-72](https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-72) PMID: [20712879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20712879/)
16. Sallum MA, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, Dos Santos CL (2008) Insight into *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae) species from Brazil. *J Med Entomol* 45: 970–81. PMID: [19058619](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19058619/)
17. Charlwood JD, Alecrim WA (1989). Capture-recapture studies with the South American malaria vector *Anopheles darlingi*, Root. *Ann Trop Med Parasitol* 83: 569–76. PMID: [2619371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2619371/)
18. Boulos M, Amato Neto V, Dutra AP, di Sant' SM, Shiroma M (1991) Frequency of malaria relapse due to *Plasmodium vivax* in a non-endemic region (São Paulo, Brazil). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 33: 143–6. PMID: [1844384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1844384/)
19. Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, et al. (1997) Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int* 46: 91–5.
20. Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gatten M, Cheng Q (2007) Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. *J Infect Dis* 195: 934–41. doi: [10.1086/512242](https://doi.org/10.1086/512242) PMID: [17330782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17330782/)
21. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, et al. (2007) Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis* 195: 927–33. doi: [10.1086/512241](https://doi.org/10.1086/512241) PMID: [17330781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17330781/)
22. Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, Goroti M, Sie A, et al. (2009) Evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *J Infect Dis* 199: 1074–80. doi: [10.1086/597303](https://doi.org/10.1086/597303) PMID: [19275476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19275476/)
23. Imwong M, Pukrittayakamee S, Grüner AC, Rénia L, Letourneur F, et al. (2005) Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using *Pvcs* and *Pvmsp1*. *Malar J* 4: 20. doi: [10.1186/1475-2875-4-20](https://doi.org/10.1186/1475-2875-4-20) PMID: [15854233](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15854233/)
24. Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, et al. (2007) Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *Int J Parasitol* 37: 1013–22. doi: [10.1016/j.ijpara.2007.02.010](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.02.010) PMID: [17442318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17442318/)
25. Karunaweera ND, Ferreira MU, Hart DL, Wirth DF (2007) Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Mol Ecol Notes* 7: 172–5.
26. Ministry of Health of Brazil (2010) Practical guidelines for malaria therapy [in Portuguese]. Brasília, Ministry of Health of Brazil, 2010. Available: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf
27. Pampana E (1963) A Textbook of Malaria Eradication. London: Oxford University Press.
28. Smith Gueye C, Sanders KC, Galappaththy GN, Rundi C, Tobgay T, et al. (2013) Active case detection for malaria elimination: a survey among Asia Pacific countries. *Malar J* 12: 358. doi: [10.1186/1475-2875-12-358](https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-358) PMID: [24103345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24103345/)
29. van Eijk AM, Ramanathapuram L, Sutton PL, Kanagaraj D, Sri Lakshmi Priya G, et al. (2016) What is the value of reactive case detection in malaria control? A case-study in India and a systematic review. *Malar J* 15: 67. doi: [10.1186/s12936-016-1120-1](https://doi.org/10.1186/s12936-016-1120-1) PMID: [26852118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26852118/)
30. Searle KM, Shields T, Hamapumbu H, Kobayashi T, Mharakurwa S, et al. (2013) Efficiency of household reactive case detection for malaria in rural Southern Zambia: simulations based on cross-sectional surveys from two epidemiological settings. *PLoS One* 8: e70972. doi: [10.1371/journal.pone.0070972](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070972) PMID: [23940677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23940677/)
31. Bejon P, Williams TN, Liljander A, Noor AM, Wambua J, et al. (2010) Stable and unstable malaria hot-spots in longitudinal cohort studies in Kenya. *PLoS Med* 7: e1000304. doi: [10.1371/journal.pmed.1000304](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000304) PMID: [20625549](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20625549/)
32. Alves FP, Gil LHS, Marrelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, et al. (2005) Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol* 42: 777–9. PMID: [16363160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16363160/)
33. McKenzie FE, Wongsrichanalai C, Magill AJ, Forney JR, Permpaich B, et al. (2006) Gametocytemia in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections. *J Parasitol* 92: 1281–5. doi: [10.1645/GE-911R.1](https://doi.org/10.1645/GE-911R.1) PMID: [17304807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17304807/)
34. Bousema T, Drakeley C (2011) Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev* 24: 377–410. doi: [10.1128/CMR.00051-10](https://doi.org/10.1128/CMR.00051-10) PMID: [21482730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21482730/)

35. Vallejo AF, García J, Amado-Garavito AB, Arévalo-Herrera M, Herrera S (2016). *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malar J* 15:48. doi: [10.1186/s12936-016-1104-1](https://doi.org/10.1186/s12936-016-1104-1) PMID: [26822406](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26822406/)
36. Baldeviano GC, Okoth SA, Arrospide N, Gonzalez RV, Sánchez JF, et al. (2015) Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* malaria outbreak, Tumbes, Peru, 2010–2012. *Emerg Infect Dis* 21: 797–803. doi: [10.3201/eid2105.141427](https://doi.org/10.3201/eid2105.141427) PMID: [25897626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25897626/)
37. Obaldia N 3rd, Baro NK, Calzada JE, Santamaria AM, Daniels R, et al. (2015) Clonal outbreak of *Plasmodium falciparum* infection in eastern Panama. *J Infect Dis* 211: 1087–96. doi: [10.1093/infdis/jiu575](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu575) PMID: [25336725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25336725/)
38. Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, Wirth DF, et al. (2007) Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J Infect Dis* 195: 1218–26. doi: [10.1086/512685](https://doi.org/10.1086/512685) PMID: [17357061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17357061/)
39. Orjuela-Sánchez P, da Silva NS, da Silva-Nunes M, Ferreira MU (2009). Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. *Am J Trop Med Hyg* 81: 961–8. doi: [10.4269/ajtmh.2009.09-0337](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0337) PMID: [19996423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19996423/)
40. Batista CL, Barbosa S, da Silva Bastos M, Viana SA, Ferreira MU (2015). Genetic diversity of *Plasmodium vivax* over time and space: a community-based study in rural Amazonia. *Parasitology* 142: 374–84. doi: [10.1017/S0031182014001176](https://doi.org/10.1017/S0031182014001176) PMID: [25068581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25068581/)
41. Carter KH, Singh P, Mujica OJ, Escalada RP, Ade MP, et al. (2015) Malaria in the Americas: trends from 1959 to 2011. *Am J Trop Med Hyg* 92: 302–16. doi: [10.4269/ajtmh.14-0368](https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0368) PMID: [25548378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25548378/)

APÊNDICE – REGISTRO FOTOGRÁFICO DAS ÁREAS ANALISADAS

Linha 5 – PDS Porto Luiz

Linha Principal – PDS Porto Luiz

Campo Novo – PDS Porto Luiz

Gleba Cumarú – PAD Pedro Peixoto

Linha 6 – PA Santo Antônio Peixoto

Linha 3 – PA São João do Balanceio

Quadra 17 – PE Redenção

Entrada do Ramal do Mano – PAE Porto Dias

Ramal Deus é Pai – PAE Porto Dias

Ramal do Carlão – PAE Porto Dias