ANACLARA PINCELLI CINTRA

**Malária na gestação na Amazônia Ocidental Brasileira:
fatores associados e implicações para a saúde materno-fetal**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

São Paulo

2018

ANACLARA PINCELLI CINTRA

**Malária na gestação na Amazônia Ocidental Brasileira:
fatores associados e implicações para a saúde materno-fetal**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Versão Corrigida

São Paulo

2018

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)

Pincelli, Anaclara
Malária na gestação na Amazônia Ocidental
Brasileira: fatores associados e implicações para a
saúde materno-fetal / Anaclara Pincelli; orientador
Marcelo Urbano Ferreira. -- São Paulo, 2018.
102 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Malária na gestação. 2. Plasmodium vivax. 3.
Amazônia . 4. Saúde materno-fetal. I. Urbano
Ferreira, Marcelo , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Anaclara Pincelli Cintra

Título da Dissertação: Malária na gestação na Amazônia Ocidental Brasileira: fatores associados e implicações para a saúde materno-fetal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 30.08.2018, considerou o(a) candidato(a):

(☒) Aprovado(a)

(☐) Reprovado(a)

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Malária associada à gestação: diagnóstico molecular, prevalência e fatores de risco no Vale do Juruá, Amazônia Brasileira

Pesquisador: Anaclara Pincelli Cintra

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56891016.2.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.600.599

Apresentação do Projeto:

Malária associada à gestação: diagnóstico molecular, prevalência e fatores de risco no Vale do Juruá, Amazônia Brasileira.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a prevalência e os fatores de risco para malária associada à gestação no município de Cruzeiro do Sul, no estado do Acre.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são muito baixos, inerentes ao procedimento de coleta de sangue das mulheres grávidas que se engajarem na pesquisa. Para os recém nascidos não haverá risco, pois será utilizado sangue do cordão umbilical. O benefício imediato para gestante e bebê será a disponibilização dos resultados dos exames com avaliação nutricional inclusa, além do acompanhamento. A longo prazo esse conhecimento pode orientar ações de prevenção e controle da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A malária continua sendo uma doença importante no mundo e em nosso país, apesar de todas as ferramentas disponíveis para combate-la. A pesquisa será realizada numa região

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

Fax: (11)3091-8405

E-mail: cep@icb.usp.br

de alta incidência e pode preencher uma lacuna de conhecimento da doença na região amazônica.

As equipes envolvidas contam com a participação da Universidade Estadual do Acre, Instituto de Ciências Biomédicas e Faculdade de Saúde Pública da USP, e Hospital da Mulher e da Criança do Juruá. Isso dá respaldo a que procedimentos corretos serão utilizados na obtenção das amostras e informações junto às voluntárias que concordarem em participar, sendo que os critérios de inclusão e exclusão estão descritos com clareza.

As condições de amostragem foram detalhadas, e a metodologia está bem descrita e é apropriada, bem como o protocolo experimental de extração do DNA do sangue para detecção do parasita por técnicas moleculares.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi anexada a folha de rosto e o projeto de pesquisa, apresentados junto à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Ministério da Saúde. O projeto está bem redigido e completo, não dando margem a dúvidas sobre a correção do desenvolvimento da pesquisa e do respeito aos aspectos éticos.

Recomendações:

Há, no TCLE, termos complicados de serem entendidos. Ex. dados socioeconômicos, demográficos e obstétricos. Mas, há outros. Além disso, colocar, no TCLE (menor) no feminino pois trata-se de gestantes. Inserir fone de contato do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências, apenas sugerimos realizar as recomendações

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer de relator e parecer consubstanciado já constante no processo e dada a explicação para pendência dada pelo pesquisador, o Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

Fax: (11)3091-8405

E-mail: cep@icb.usp.br

Continuação do Parecer: 1.600.599

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_694072.pdf	12/04/2016 14:53:21		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMestradoAnaclara.pdf	11/04/2016 14:42:19	Anaclara Pincelli Cintra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPlataformaBrasilmenor.pdf	11/04/2016 14:37:38	Anaclara Pincelli Cintra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPlataformaBrasilmaior.pdf	11/04/2016 14:37:25	Anaclara Pincelli Cintra	Aceito
Folha de Rosto	images.pdf	11/04/2016 14:33:05	Anaclara Pincelli Cintra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 20 de Junho de 2016

Assinado por:
Camila Squarzoni Dale
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

Fax: (11)3091-8405

E-mail: cep@icb.usp.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço com carinho o orientador deste trabalho, Marcelo. Agradeço por ter me acolhido, por ter me apresentado o Vale do Juruá. Agradeço pelo tempo dedicado ao meu aprendizado - especialmente pelos dias que analisamos os dados e pelos dias em campo, que foram dias muito bons.

Agradeço com respeito as participantes deste estudo e seus bebês, que dedicaram seu tempo para participar desta pesquisa.

Agradeço à professora Dra. Marly, por ter possibilitado e ajudado a construir esse trabalho, e por ter me acolhido no projeto Mina. À equipe do projeto Mina, em especial ao Paulo que coletou, com sensibilidade, a maioria dos dados e amostras usados neste trabalho, e que sempre esteve disponível para responder minhas muitas dúvidas; à Bárbara e à Maira, pelo entusiasmo, disponibilidade e ajuda com a organização dos bancos de dados; à Juliana, que fez com cuidado as extrações de DNA das amostras de cordão umbilical.

Às equipes da maternidade do Hospital da Criança e da Mulher do Juruá e da Saúde da Família de Cruzeiro do Sul.

Agradeço à Nathália que junto ao Marcelo, e de forma tão bonita, me apresentou um pouco do Acre e o trabalho em campo. Ter construído este trabalho conhecendo a região de estudo foi fundamental.

Agradeço a toda a equipe do laboratório de Parasitologia Experimental e Aplicada pela convivência e aprendizado. Especificamente, agradeço à Maria José pelo suporte logístico; ao Rodrigo, pela grande e essencial ajuda com a busca das gestantes no banco de dados do Sivep; à Priscila e à Laís pela disponibilidade, conversas e ajuda com as questões de biologia molecular; ao Jaques, pela ajuda com o manuseio dos aparelhos utilizados para os diagnósticos; ao Pablo, pela ajuda com as análises dos dados. Agradeço à Susana e à Nathália, pelo encontro; à Thais, pela amizade e humor; à Vanessa, pelo acolhimento nos projetos futuros.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Daniel, Dra. Dirce e Dr. Expedito, e da banca de defesa da dissertação, Dra. Flor, Dra. Alicia e Dr. Daniel, pelo tempo dedicado e sugestões construtivas.

Ao professor Dr. João Marcelo pela estadia em seu laboratório.

Agradeço a FAPESP pelo suporte financeiro, fundamental para a realização deste trabalho.

À Ângela, André e à Mary, por terem revisado com carinho o texto.

Agradeço ao Dr. Rogério pela sugestão de procurar o Marcelo para seguir meus estudos.

Ao Gabriel, Fábio e Lucas por terem me acompanhado durante a construção deste trabalho. Ao Ale, por estar aqui. À Mary, Malu, Marina, Joana, Bella, Mari e Nora, pela torcida de sempre.

À minha mãe, por ter possibilitado minha formação e me ensinado que o otimismo e a fé de acreditar que o mundo pode melhorar, são revolucionários. À minha avó Leoni, por ter me incentivado a estudar e a voltar para São Paulo. As duas deixam a vida terna e bonita.

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente estudo integra um conjunto de pesquisas epidemiológicas sobre condições de saúde e nutrição materno-infantil em Cruzeiro do Sul, Acre: *Materno-Infantil no Acre: coorte de nascimentos da Amazônia Ocidental Brasileira* (MINA-Brasil). O estudo MINA-Brasil é coordenado por pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP) em colaboração com pesquisadores da Universidade Federal do Acre (UFAC) e da Harvard T. H. Chan School of Public Health (HSPH).

Com verba do Programa Ciência Sem Fronteiras, chamada nº 71/2013 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), o Estudo MINA-Brasil foi contemplado com auxílio à pesquisa e uma Bolsa Pesquisador Visitante Especial (PVE), para a Doutora Márcia Caldas de Castro da HSPH (processo CNPq nº 407255/20133). Em 2015, recursos adicionais foram concedidos pela Fundação Maria Cecília Souto Vidigal e na Chamada PPSUS 001/2015 FAPAC - Programa Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde FAPAC/SESACRE/PPSUS MS/CNPq - e, em 2017, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na modalidade auxílio temático à pesquisa (processo FAPESP nº 2017/00270-6). Anaclara Pincelli Cintra recebeu bolsa de mestrado FAPESP (processo FAPESP nº 2016/06932-0).

MEMBROS DA COORDENAÇÃO DO MINA-BRAZIL STUDY WORKING GROUP

Alícia M. Manitto - Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina da USP; Bruno P. da Silva e Rodrigo M. de Souza - Universidade Federal do Acre (UFAC, Campus Floresta); Marly A. Cardoso, Bárbara H. Lourenço, Suely G. A. Gimeno, Máira B. Malta, Paulo A. R. Neves - Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública da USP; Márcia C. Castro - Department of Global Health and Population, Harvard T. H. Chan School of Public Health.

“As mulheres construíam as pessoas meticulosamente, sem sequer olharem ou se preocuparem demasiado com isso. Construíam-lhes cada osso, cada veia e cada fio de cabelo. E depois abanavam-se e provocavam o embalo das águas interiores que suavemente desenhavam os dedos das pessoas a construir. O Crisóstomo pensava que as mulheres assinavam cada filho. Assinavam na pele de cada filho, nunca repetindo entre elas os códigos com que para sempre distinguiam, uma a uma, as pessoas que construíam. O Crisóstomo pensava que a construção acontecia como no mar profundo e que as mulheres eram profundas e os filhos seres de água.”

O filho de mil homens

Valter Hugo Mãe

RESUMO

PINCELLI, Anaclara. **Malária na gestação na Amazônia Ocidental Brasileira: fatores associados e implicações para a saúde materno-fetal**. 2018. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Este trabalho observacional teve como objetivo investigar os fatores associados com o desenvolvimento da malária ao longo da gestação e as implicações da infecção por *Plasmodium* no momento do parto e da malária clínica ao longo da gestação para o crescimento fetal e para o nível de hemoglobina materna no parto, em uma região de alta endemicidade para a doença, onde há cocirculação de *P. falciparum* e *P. vivax*, na Amazônia Brasileira. Ao todo 1.180 gestantes participaram das análises de fatores associados ao desenvolvimento de malária gestacional e 1.140 - as gestantes que tiveram filhos nascidos vivos não gêmeos - participaram das análises da associação entre ocorrência de malária gestacional e os desfechos gestacionais abordados neste estudo. A prevalência de malária clínica antenatal, diagnosticada por microscopia de gota espessa, foi de 8,0%, sendo 74,6% dos casos notificados como *P. vivax*; a prevalência de infecção por *Plasmodium* no momento do parto, diagnosticada por qPCR, foi de 7,5% - ao todo 12,5% das gestantes que participaram deste estudo tiveram malária clínica antenatal ou infecção por *Plasmodium* no parto. A grande maioria (89,9%) das infecções por *Plasmodium* no parto foram assintomáticas. Morar em área rural foi o principal fator associado à malária gestacional na população deste estudo. No que se refere ao impacto da malária para os desfechos de crescimento fetal e nível de hemoglobina no parto, observou-se que malária antenatal provocou redução média de 0,36 (intervalo de confiança [IC] 95%, - 0,57 - -0,14 $p = <0,01$) no escore z de peso ao nascer, de 0,31 (IC 95%, - 0,54 - -0,08, $p = 0,01$) no escore z de comprimento ao nascer, e de 0,34 g/100 mL (IC 95%, -0,62 - -0,05 $p = 0,02$) na concentração de hemoglobina no momento do parto. Foi observado que um único caso de malária vivax antenatal foi suficiente para afetar negativamente o crescimento fetal e a concentração de hemoglobina materna. Quando foram analisados somente os casos de malária vivax repetidas, o efeito negativo foi ainda mais pronunciado. Entre as 637 amostras de cordão umbilical que tiveram diagnóstico molecular feito, 4 (0,6%) foram positivas para *P. vivax* e 2 (0,3%) para *P. falciparum*, totalizando uma prevalência de 0,9% de malária congênita na população de estudo. Apenas um dos casos de malária congênita apresentou sintomas. Foram observadas falhas de notificação no banco de dados do sistema de Informação Epidemiológica (SIVEP – Malária), e há indicação de falhas no tratamento de malária na gestação no Brasil. Os resultados deste estudo confirmam que a malária vivax na gestação pode ter implicações graves para a saúde materno-fetal. No âmbito local os resultados deste estudo evidenciam a malária na gestação como problema de saúde pública nas regiões endêmicas do Brasil.

Palavras-chave: malária na gestação; *Plasmodium vivax*; Amazônia

ABSTRACT

PINCELLI, Anaclara. **Malaria in pregnancy in the Western Brazilian Amazon: associated factors and impact on maternal and fetal health** 2018. 102p. Master thesis (Science) – Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

The main objectives of this observational study were to investigate the associations between malaria in pregnancy (MiP) and sociodemographic and biological variables of mothers and estimate its impact on birth weight and length and maternal hemoglobin in 1,180 women from Juruá Valley, the main malaria hotspot in Brazil. Antenatal malaria episodes, 74.6% of them due to *Plasmodium vivax*, were microscopically diagnosed in 8.0% of the women and were associated with an average reduction in birth weight z-scores of 0.36 (95% confidence interval [CI] -0.57 - -0.14 $p = <0.01$) and in birth length z-scores of 0.31 (CI 95%, - 0.54 - -0.08, $p = 0.01$), compared with malaria-free pregnancies. Affected mothers had a mean decrease in hemoglobin concentration at delivery of 0.34 g/100 mL (CI 95%, -0.62 - -0.05 $p = 0.02$). Although repeated antenatal vivax infections were associated with poorer birth outcomes, even a single vivax malaria episode was associated with a significant reduction in birth weight and length and maternal hemoglobin. Overall, 7.5% women had the parasite's DNA found in peripheral blood at delivery. Most (83.1%) of these 89 perinatal infections were due to *P. vivax* and only 7.9% of them progressed to symptomatic disease after delivery. *P. vivax* and *P. falciparum* DNA was found in 0.6% and 0.3% of 637 cord blood samples examined, respectively, but only one newborn developed clinical neonatal malaria. Living in rural areas was the main factor associated with gestational malaria in the study population. Moreover, we found further evidence that health-care providers often fail to comply with the country's malaria treatment guidelines for pregnant women in Brazil. We retrospectively found that Primaquine was prescribed for more than half of the antenatal *P. vivax* infections diagnosed during the study, not only in the first trimester (when the pregnancy status might be unknown) but also in infections correctly reported as MiP. Our results further challenge the notion that vivax malaria is relatively benign during pregnancy and call for better strategies for its prevention.

Keywords: malaria in pregnancy; *Plasmodium vivax*; Amazon

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa dos países endêmicos para malária em 2010 e em 2016.....	19
Figura 2	Estimativa da distribuição de <i>P. vivax</i> no ano de 2009.....	22
Figura 3	Fluxograma do estudo.....	47
Figura 4	Distribuição de peso ao nascer, comprimento ao nascer e nível de hemoglobina materna no parto de gestantes que tiveram e que não tiveram malária antenatal.....	53
Figura 5	Impacto da malária gestacional para peso ao nascer.....	60
Figura 6	Impacto da malária gestacional para comprimento ao nascer.....	61
Figura 7	Impacto da malária gestacional para o nível da hemoglobina materna no parto.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação entre a população de estudo e a população que aceitou participar do estudo mas não foi incluída nas análises por falta de amostra sanguínea coletada no parto.....	48
Tabela 2	Razão de <i>odds</i> para associação entre características das participantes do estudo e o diagnóstico de malária antenatal ou de infecção por <i>Plasmodium</i> no parto.....	55
Tabela 3	Razão de <i>odds</i> , ajustada, para associação entre características das participantes do estudo e o diagnóstico de malária antenatal ou de infecção por <i>Plasmodium</i> no parto.....	56
Tabela 4	Impacto de malária antenatal e infecção por <i>Plasmodium</i> no parto para o tamanho ao nascer e nível de hemoglobina materna no parto, em Cruzeiro do Sul, Acre, depois de ajustar para fatores de confusão por análise de regressão linear múltipla.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DARC	<i>Duffy Antigen Receptor for chemokines</i>
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DUM	Data da Última Menstruação
ESF	Estratégia da Saúde e da Família
eSF	Equipe de Saúde da Família
eSFF	Equipe de Saúde da Família Fluvial
G6PD	Glicose-6-fosfato Desidrogenase
HbF	Hemoglobinas Fetais
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IDHM	Índice de Desenvolvimento Humano Municipal
IG	Idade Gestacional
IgG	Imunoglobulina G
IPA	Índice Parasitário Anual
IPTp	<i>Intermittent Preventive Treatment in Pregnancy</i>
INTERGROWTH-21st	<i>International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century</i>
MATLAB	<i>Matrix Laboratory</i>
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
MGRS	<i>Multicentre Growth Reference Study</i>
MINA Brasil	Materno-Infantil no Acre: coorte de nascimentos da Amazônia Ocidental Brasileira
O	Oeste
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
pb	Par de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PfEMP-1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>

PIG	Pequenas para a Idade Gestacional
PNSIPCF	Política Nacional de Saúde Integral das Populações do Campo e da Floresta
PvDBP	<i>Duffy binding protein</i> de <i>P. vivax</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	<i>ribosomal RNA</i> - Ácido Ribonucleico Ribossômico
S	Sul
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIVEP-Malária	Sistema de Informação Epidemiológica - Malária
SUS	Sistema Único de Saúde
USG	Ultrassonografia
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAR2CSA	<i>Variant Surface antigen 2-CSA</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
'	Minuto
"	Segundo
cm	Centímetro
g	Grama
mL	Mililitro
km	Quilômetro
km ²	Quilômetro quadrado
µl	Microlitro
nM	Nano molar
n	Número
nº	Número
%	Porcentagem
x	Sinal de multiplicação
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
χ ²	Teste qui-quadrado
B	Coefficiente de regressão não padronizado
P	Valor-p - probabilidade de significância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	MALÁRIA	19
1.2	MALÁRIA VIVAX	21
1.3	MALÁRIA NO BRASIL	23
1.4	MALÁRIA NA GESTAÇÃO	24
1.4.1	Suscetibilidade à infecção	28
1.4.2	Malária congênita	29
1.4.3	Prevenção e tratamento da malária associada à gestação no Brasil	31
1.5	LACUNAS NO CONHECIMENTO	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3	METODOLOGIA.....	35
3.1	ÁREA DE ESTUDO	35
3.1.1	Atenção à saúde materna em Cruzeiro do Sul	35
3.2	DESENHO DO ESTUDO	36
3.3	POPULAÇÃO DE ESTUDO	37
3.4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
3.5	COLETA DE DADOS E AMOSTRAS	37
3.5.1	Acompanhamento de gestantes da região urbana de Cruzeiro do Sul	38
3.5.2	Parturientes da maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá	38
3.5.3	Busca dos casos de malária notificados pelo SIVEP ao longo da gestação.....	39
3.6	CÁLCULO DO ÍNDICE DE RIQUEZA	40
3.7	DEFINIÇÕES CLÍNICAS	41
3.8	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	42
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4	RESULTADOS	46
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO	46
4.1.2	Perdas	47
4.2	MALÁRIA GESTACIONAL	51
4.3	DESFECHOS MATERNOS E DO RECÉM-NASCIDO	51
4.4	FATORES ASSOCIADOS À MALÁRIA GESTACIONAL	54
4.5	IMPACTO CLÍNICO DA MALÁRIA GESTACIONAL	57
4.6	MALÁRIA CONGÊNITA	63
4.7	FALHAS NA NOTIFICAÇÃO E NO TRATAMENTO	63
5	DISCUSSÃO	64
5.1	OCORRÊNCIA	64
5.1.1	Gestantes, um possível reservatório de malária na Amazônia Brasileira	66
5.2	IMPACTO DA MALÁRIA AO LONGO DA GESTAÇÃO PARA ASPECTOS DA SAÚDE MATERNO-FETAL	67
5.2.1	Reflexões sobre a metodologia utilizada para análise	67
5.2.2	Impacto da malária para desfechos gestacionais	68
5.3	MALÁRIA CONGÊNITA	70

5.4 TRATAMENTO E NOTIFICAÇÃO	70
5.5 AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES DO ESTUDO	73
5.6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ..	88
APÊNDICE B - QUESTIONÁRIOS	91
QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO E HISTÓRIA DE SAÚDE	91
FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO NO PARTO	97
ANEXO 1 – PLASMÍDEOS	102

casos e de mortes pela doença. A Venezuela, por exemplo, foi modelo de erradicação da malária nas Américas, tendo sido considerada, pela OMS, livre da doença nas regiões mais populosas do país em 1961. Porém, a partir de 2008, com o agravamento da crise política, os casos de malária passaram a aumentar anualmente, sendo que entre 2015 e 2016 o aumento foi de 76% (WHO, 2017), e a Venezuela tornou-se o país com maior número de casos de malária nas Américas. O aumento da incidência de malária nesse país é acompanhado por um movimento emigratório humano, circunstância que pode aumentar o número de casos nos países vizinhos (OBSERVATORIO VENEZOLANO DE LA SALUD, 2016; RECHT et al., 2017). O recrudescimento da malária na Venezuela ilustra a fragilidade dos programas de controle e tratamento da doença, bem como o seu rápido restabelecimento quando em ambiente vulnerável.

Assim como os fatores políticos, os aspectos biológicos que envolvem a malária também são desafios para o controle e eliminação da doença. A malária é uma doença vetorial, transmitida aos humanos pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, e tem como agente etiológico organismos do gênero *Plasmodium*. Hoje são conhecidas cinco espécies do gênero *Plasmodium* que podem infectar humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale* e *P. malariae* (COWMAN et al., 2017). *P. falciparum* e *P. vivax*, são os principais responsáveis pela mortalidade e morbidade por malária em humanos. Portanto, os esforços de pesquisa e de controle da malária são destinados, principalmente, a essas duas espécies.

A infecção do ser humano por *Plasmodium* sp. acontece durante o repasto sanguíneo do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado, quando há a inoculação de esporozoítos, presentes nas glândulas salivares do mosquito, no tecido subcutâneo humano. Parte dos esporozoítos inoculados alcançam a corrente sanguínea e conseguem migrar para o fígado, onde passam por vários hepatócitos até se alojarem em um deles. Passados de 8 a 15 dias, depois de diversas replicações mitóticas, são liberados dos hepatócitos milhares de merozoítos na corrente sanguínea. Os merozoítos invadem as hemácias do hospedeiro e iniciam um novo processo de reprodução assexuada que origina mais merozoítos. A hemácia se rompe e os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, provocando a sintomatologia clínica da malária e um novo ciclo de invasão das hemácias. Os merozoítos, uma vez dentro das hemácias, podem originar novos merozoítos ou gametócitos, que são as formas do parasito capazes de infectar o vetor durante o repasto sanguíneo (MÉNARD et al., 2013; COWMAN et al., 2017).

A mortalidade e morbidade por malária estão associadas com características do parasito, com determinantes sociais - que influenciam, por exemplo, no risco de infecção, nas condições

físicas do hospedeiro e no acesso aos antimaláricos - e com as características biológicas do hospedeiro (MILLER et al., 2002). A seguir serão descritos: (a) aspectos de um dos agentes etiológicos da malária, *P. vivax*; (b) aspectos da malária no Brasil; e, por fim, (c) aspectos da malária associada à gestação.

1.2 MALÁRIA VIVAX

Estima-se que 4% dos casos de malária no mundo sejam causados por *P. vivax*. Esse parasito, por admitir condições ecológicas variadas, desafia o controle da doença, ultrapassa os limites de distribuição de *P. falciparum*, e coloca 2,5 bilhões de pessoas sob risco de infecção (GETTING et al., 2012) (Figura 2). Atualmente, o *P. vivax* é responsável por 64% dos casos de malária do continente americano, por 30% da região do Mediterrâneo Oriental, e por 40% dos casos do Sudeste Asiático (WHO, 2017). Quando comparado com *P. falciparum*, *P. vivax* é mais adaptado para cumprir seu ciclo biológico sem matar o hospedeiro (ANSTEY et al., 2009). Por isso, a malária causada por essa espécie foi tradicionalmente associada à benignidade. Entretanto, já é reconhecida a existência de casos de malária vivax graves, e a possibilidade dessa espécie desenvolver resistência aos antimaláricos (ANSTEY et al., 2009; PRICE et al., 2009; MUELLER et al., 2009).

P. vivax possui especificidades biológicas que definem algumas das dificuldades de controle e das características clínicas da malária causada por essa espécie. Destaca-se a especificidade, partilhada com *P. ovale*, de possuir a possibilidade de desenvolver formas dormentes intra-hepáticas, os chamados hipnozoítos. Esse mecanismo de dormência possibilita recaídas futuras, que podem ocorrer meses depois da infecção primária. O único medicamento disponível capaz de eliminar hipnozoítos é a primaquina. Em decorrência do risco de hemólise em pessoas com deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (CARSON et al., 1956), o tratamento com primaquina deveria se restringir a pessoas sem essa deficiência. Porém, os testes de eficiência de G6PD costumam não fazer parte da rotina de diagnóstico e tratamento de malária nos países endêmicos. Outra especificidade, também relacionada com o ciclo biológico de *P. vivax*, é o desenvolvimento precoce de gametócitos no sangue periférico, antes do aparecimento de sintomas (MUELLER et al., 2009). Os gametócitos, ao serem ingeridos pelo mosquito do gênero *Anopheles*, dão continuidade ao ciclo de vida do parasito. Assim, a pessoa infectada pode se tornar reservatório antes mesmo de apresentar sintomas e poder receber o tratamento adequado. A formação de hipnozoítos e a presença precoce de

gametócitos são fatores que favorecem a transmissão e desafiam o controle da malária vivax (ARMISTEAD; ADAMS, 2018).

Diferente de *P. falciparum* que, apesar de preferir hemácias jovens, invade hemácias de todas as idades, *P. vivax* invade somente reticulócitos (SIMPSON et al., 1999). Os reticulócitos são hemácias muito jovens, que ainda possuem resquícios de RNA em seu citoplasma, têm maturação rápida e estão presentes principalmente na medula óssea, sendo infrequentes na corrente sanguínea. A parasitemia em infecções por *P. vivax* costuma ser baixa, chegando a ser submicroscópica, justamente em decorrência da pouca disponibilidade de reticulócitos na corrente sanguínea (ARMISTEAD; ADAMS, 2018). O tropismo por reticulócitos dificulta o cultivo de *P. vivax* e, conseqüentemente, limita os estudos sobre a biologia desse parasito (ARMISTEAD; ADAMS, 2018).

O processo de invasão de reticulócitos por *P. vivax* depende de interações entre proteínas do parasito e receptores da célula hospedeira. A interação entre a proteína PvDBP (*Duffy binding protein* de *P. vivax*) e seu receptor nas hemácias do hospedeiro, o grupo sanguíneo Duffy (DARC), é irreversível e uma das interações consideradas fundamentais para o ciclo de vida do parasito. Essa interação é tão importante que indivíduos que não possuem o receptor para PvDBP, os chamados indivíduos Duffy negativos, costumam não desenvolver malária vivax (MILLER et al., 1976).

Figura 2 – Estimativa da distribuição de *P. vivax* no ano de 2009

Em rosa escuro, regiões de transmissão estável ($IPA \geq 0,1$); em rosa claro, regiões de transmissão instável ($IPA < 0,1$); em hachurado, regiões onde $\geq 90\%$ da população é estimada ser Duffy negativa; em cinza, regiões sem transmissão. Adaptado de Guerra et al. (2010).

Seja porque *P. vivax* foi por muito tempo associado à benignidade, ou porque metodologias de cultivo *in vitro* desse parasito são difíceis de serem estabelecidas, muitos aspectos da biologia da malária vivax permanecem desconhecidos.

1.3 MALÁRIA NO BRASIL

A transmissão da malária no Brasil é concentrada na Região da Amazônia Legal: mais de 99% dos casos do país ocorrem nessa região (WHO, 2016b), sendo que 89% são notificados como *P. vivax*, 11%, como *P. falciparum*, e alguns poucos como *P. malariae* (WHO, 2016b). Apesar do Brasil ter diminuído o número de casos de malária em 77% entre os anos de 2000 e 2015 (BRASIL, 2016a), no ano de 2017 houve 48% de aumento nos casos notificados de malária no país, que passaram de 117.832 em 2016 para 174.522 em 2017 (PAHO, 2018). O Plano Nacional de Saúde 2016-2019 tem como meta, até 2019, reduzir para 100.000 o número de casos autóctones de malária (BRASIL, 2016a).

Distante da homogeneidade, a Amazônia Legal apresenta diversidade epidemiológica. Três cidades situadas no Vale do Alto Juruá, Estado do Acre - Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Rodrigues Alves - no ano de 2016 foram responsáveis por 24,9% dos casos de malária notificados no Brasil. Cruzeiro do Sul, entre as três a maior cidade, contribuiu sozinha com 15,1% desses casos. O índice parasitário anual (IPA) – calculado a partir do número de exames positivos de malária por mil habitantes – das três cidades estão entre os maiores do Brasil: 231,9 em Cruzeiro do Sul, 436,4 em Mâncio Lima e 343,4 em Rodrigues Alves (BRASIL, 2017).

A malária no Brasil é uma doença de notificação obrigatória. A notificação dos casos ocorridos na Região Amazônica deve ser feita por meio da ficha de notificação de casos de malária (SIVEP-Malária), e daqueles ocorridos fora da Região Amazônica, na ficha do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Os medicamentos antimaláricos são acessíveis somente através do Sistema Único de Saúde (SUS), depois de confirmação laboratorial de infecção por *Plasmodium* pelo método diagnóstico de microscopia de gota espessa. Essa metodologia diagnóstica é hoje considerada o padrão ouro de diagnóstico para malária, tendo sensibilidade, em campo, de 100 parasitos por ul de sangue (BRASIL, 2010). A efetividade do método diagnóstico de microscopia de gota espessa varia de acordo com a experiência do leitor, com o nível de parasitemia, e com a qualidade da lâmina preparada.

Na Amazônia Legal, o desenvolvimento de imunidade clínica à malária adquirida depois de vários episódios de infecção, ou associada com fatores genéticos do hospedeiro

(GALATAS et al., 2016), é comum; tão comum que as infecções assintomáticas podem ser mais prevalentes do que os casos de infecções sintomáticas (ALVES et al., 2002; BARBOSA et al., 2014). As estratégias de controle de malária no Brasil, com exceção da malária associada à gestação, restringem-se aos casos sintomáticos: o diagnóstico de malária é feito através da busca passiva de casos e, eventualmente, através da busca ativa de casos em indivíduos febris. Ainda que a busca ativa incluísse pessoas sem sintomatologia clínica, parte das infecções não seriam tratadas porque os casos assintomáticos são comumente subpatentes ao exame de gota espessa (BARBOSA et al., 2014). Assim, com a política de controle de malária vigente, não é possível diagnosticar casos assintomáticos de infecção por *Plasmodium*, e a manutenção da doença no país é favorecida.

1.4 MALÁRIA NA GESTAÇÃO

A malária associada à gestação é um risco para a mãe, para o feto e para o recém-nascido. Ao longo da gestação acontecem alterações fisiológicas no organismo materno que possibilitam o desenvolvimento fetal e que podem aumentar a suscetibilidade a doenças infecciosas (KOURTIS et al., 2014). No que se refere à malária, a gestação está associada com o aumento da incidência e da gravidade da doença (ROGERSON et al., 2007; KOURTIS et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2015), podendo provocar anemia materna, aborto espontâneo, retardo do crescimento intrauterino, prematuridade, natimortalidade, baixo peso ao nascer e aumento da mortalidade materna e neonatal (MACGREGOR; AVERY 1974; DESAI et al., 2007). No ano de 2007 foi estimado que 125,2 milhões de gestantes estiveram sob risco de infecção por *Plasmodium* (DELLICOUR et al., 2010).

Os efeitos da malária associada à gestação são bem conhecidos para o continente africano, onde ocorrem 91% das mortes decorrentes dessa doença no mundo. Nesse continente, o principal parasito circulante é *P. falciparum*, e ocorre a maior incidência, morbidade e mortalidade por malária em gestantes (WHO, 2017). Na África a malária associada à gestação é um problema de saúde pública reconhecido, e a OMS recomenda que nas regiões de média e alta transmissão seja feito tratamento preventivo com sulfadoxina-pirimetamina, em três doses, ao longo da gestação - *intermittent preventive treatment in pregnancy*, IPTp (WHO, 2017). Nas Américas, no Sudeste Asiático e no Oeste do Pacífico, o panorama é diferente. Com morbidade e mortalidade menores do que no continente africano, nessas regiões a malária na gestação permaneceu negligenciada durante muito tempo e somente nos últimos anos foi reconhecida

como problema de saúde pública. Essa negligência está relacionada com a falsa percepção de que *P. vivax* - espécie responsável por 64% dos casos de malária nas Américas e por 40% dos casos no Sudeste Asiático (WHO, 2017) - é um parasito benigno (RIJKEN et al., 2012; YANOW et al., 2016).

A virulência de *P. falciparum* deve-se, em grande parte, à capacidade de hemácias parasitadas com formas maduras desse parasito serem sequestradas da circulação para os órgãos do hospedeiro, em um processo de evasão do sistema imune que pode provocar malária cerebral e placentária (MILLER et al., 2002; CARVALHO et al., 2010). A malária placentária caracteriza-se por processo inflamatório, deposição de pigmento malárico (hemozoína), e modificações nos tecidos placentários, que colocam em risco os desfechos gestacionais (ISMAIL et al., 2000; UMBERS et al., 2011). Em decorrência do sequestro, hemácias parasitadas com formas maduras de *P. falciparum* raramente são encontradas na corrente sanguínea (CARVALHO et al., 2010). A citoadesão de *P. falciparum* é possibilitada, principalmente, pela interação entre as proteínas PfEMP-1 do parasito (Proteína 1 da membrana do eritrócito) expostas na membrana da hemácia parasitada, codificadas pelos genes *var*, e receptores das células endoteliais ou do sinciciotrofoblasto (KYES et al., 2001).

O sequestro de *P. vivax* não é consenso. Porque hemácias parasitadas com formas maduras de *P. vivax* são comuns no sangue do hospedeiro infectado, o sequestro foi considerado ausente em infecções por esse parasito (CARVALHO et al., 2010). Com o reconhecimento que esse parasito pode levar a quadros graves de malária e afetar o desenvolvimento fetal, o sequestro passou a ser considerado uma possibilidade de mecanismo biológico associado à patologia da malária vivax (CARVALHO et al., 2010). Na medida em que a presença de *P. vivax* na placenta já foi confirmada por diagnóstico molecular e microscópico e ainda, considerando que pigmento malárico já foi encontrado na placenta, é possível supor que hemácias parasitadas por *P. vivax* possam ser sequestradas nesse órgão (MCGREADY et al., 2004; CARVALHO et al., 2011; MAYOR et al., 2012; BRUTUS et al., 2013; BARDAJÍ et al., 2017). Além disso, em ensaios *in vitro*, a citoaderência de *P. vivax*, ainda que em níveis bastante menores do que de *P. falciparum*, acontece (CARVALHO et al., 2010; CHOTIVANICH et al., 2012).

Ainda que o sequestro de hemácias parasitadas por *P. vivax* não seja questão totalmente resolvida, já é reconhecido que a malária vivax ao longo da gestação pode afetar a saúde placentária. Infecção por *P. vivax* ao longo da gestação foi associada com aumento da espessura da barreira placentária - condição que pode diminuir a passagem de nutrientes e oxigênio para

o feto e indicar inflamação - e com o aumento do número de células mononucleares - que também pode ser um indicativo de processo inflamatório (SOUZA et al., 2013; MACHADO FILHO et al., 2014; ATAÍDE et al., 2015). A exposição à malária vivax na gestação foi associada, também, com alterações na arquitetura das vilosidades placentárias (CHAIKITGOSIYAKUL et al., 2014).

Tanto as infecções causadas por *P. vivax* como as causadas por *P. falciparum*, quando associadas à gestação, têm impacto negativo para a saúde materno-fetal e infantil. Malária na gestação possui associação negativa com o crescimento intrauterino, levando ao aumento de risco de nascimento de crianças pequenas para a idade gestacional (PIG) (BRABIN, 2004; BRUTUS et al., 2013; MOORE et al., 2017a). As crianças consideradas pequenas para a idade gestacional estão sujeitas a maior risco de mortalidade e morbidade neonatal, sendo mais propensas a infecções, depressão respiratória perinatal, icterícia, policitemia, hipoglicemia, hipotermia e podem apresentar dificuldade em se alimentar (LEE et al., 2017). Além disso, a restrição de crescimento intrauterino pode afetar negativamente o neurodesenvolvimento (MURRAY et al., 2015).

A malária associada à gestação pode ser incompatível com a vida fetal, causando aborto e natimortalidade (MCGREADY et al., 2012; MOORE et al., 2016; MOORE et al., 2017b). Infecção por *P. vivax* diagnosticada no parto, quando não diagnosticada e tratada ao longo da gestação, foi associada com natimortalidade (MOORE et al., 2017b). Infecção por *P. falciparum* na gestação foi associada com natimortalidade, independentemente da idade gestacional no momento do diagnóstico. Na África Sub-Saariana estima-se que 20% dos casos de natimortalidade sejam decorrentes da malária ao longo da gestação (MOORE et al., 2017b).

O número de episódios e a idade gestacional no momento da infecção são fatores que influenciam os efeitos da malária para os desfechos gestacionais. Em estudo realizado na fronteira entre a Tailândia e Mianmar, região de cocirculação de *P. vivax* e *P. falciparum*, foi observado que episódios repetidos de malária aumentam linearmente o risco de nascimento de criança pequena para a idade gestacional (MOORE et al., 2017a). Nesse mesmo estudo, os casos de malária diagnosticados no terceiro trimestre de gestação foram os que se associaram com maior força com os desfechos de nascimento de criança pequena para idade gestacional e prematuridade (MOORE et al., 2017a). Também em estudos realizados na fronteira entre a Tailândia e Mianmar, infecção por *P. vivax* e *P. falciparum* no primeiro trimestre de gestação, assintomática ou clínica, foi associada com aumento de risco de aborto (MCGREADY et al., 2012; MOORE et al., 2016); um único caso diagnosticado e tratado no primeiro trimestre de

gestação não afetou o peso ao nascer, sugerindo que o feto em desenvolvimento, caso sobreviva à exposição à malária no primeiro trimestre de vida, consegue se recuperar ao longo dos meses subsequentes da gestação (MCGREADY et al., 2012). Porém, em estudo realizado em Benin, onde quase a totalidade dos casos de malária são causados por *P. falciparum*, foi observado que as infecções nos quatro primeiros meses de gestação são particularmente prejudiciais para o crescimento fetal, estando associadas com decréscimo médio de 100g no peso ao nascer (HUYNH et al., 2011).

A exposição à malária na vida intrauterina pode comprometer a imunidade infantil. Durante o desenvolvimento intrauterino, anticorpos IgG são transportados da mãe para o feto através da placenta, principalmente durante o terceiro trimestre de gestação (SIMISTER, 2003). A malária gestacional, assim como outras infecções, pode diminuir a eficiência da passagem de anticorpos maternos para o feto (BRAIR et al., 1994; CUMBERLAND et al., 2007; MCKITTRICK et al., 2017). A menor passagem de anticorpos agrava-se com a prematuridade, que também é ocorrência associada à malária (MOORE et al., 2017a). Além disso, crianças expostas à malária na vida intrauterina podem apresentar redução da capacidade de soroconversão pós-vacinal nos primeiros meses de vida (MALHOTRA et al., 2015). Existe a possibilidade, portanto, de que crianças expostas à malária durante a vida intrauterina apresentem perda da resposta humoral, seja por terem herdado menos anticorpos maternos ao longo do desenvolvimento fetal, seja pela menor eficiência de soroconversão. A exposição à malária na vida intrauterina foi associada também com fenótipo imunotolerante para malária, que permanece ao longo dos três primeiros anos de vida, podendo aumentar a incidência de malária falciparum em até 61% (SCHWARZ et al., 2008; MALHOTRA et al., 2009).

A anemia é uma das implicações mais comuns da malária na gestação para a saúde materna (NOSTEN et al., 1999; BRUTUS et al., 2013; MCCLURE et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2015; BARDAJÍ et al., 2017). Malária clínica, provocada por infecção por *P. vivax* ou *P. falciparum*, pode aumentar em mais de cinco vezes o risco de anemia na gestação (BARDAJÍ et al., 2017). Mesmo as infecções diagnosticadas no início da gestação, nos quatro primeiros meses, estão associadas com aumento de risco de anemia no momento do parto (HUYNH et al., 2011). Além do nível de hemoglobina poder não se recuperar após a exposição à malária, pode diminuir após o parto, que comumente é acompanhado de perda sanguínea (BREYMANN, 2015). Episódios repetidos de malária podem provocar agravamento da queda dos níveis de hemoglobina (NOSTEN et al., 1991; LOPEZ-PEREZ et al., 2016). A anemia na gestação está associada com piora nos desfechos gestacionais, e coloca em risco a vida da

gestante e do feto (BREYMAN, 2015). A razão de *odds* para morte materna em gestantes com anemia severa, quando comparadas com gestantes que não possuem anemia severa, é estimada em 2,36 (IC 95% 1,60 - 3,48) (DARU et al., 2018).

1.4.1 Suscetibilidade à infecção

Durante a exposição à malária falciparum na gestação há possibilidade de desenvolvimento de imunidade humoral duradoura que pode contribuir para a proteção nas gestações subsequentes (ROGERSON et al., 2007; ATAÍDE et al., 2014; TEO et al., 2014). Assim, mulheres na primeira gestação, as primigestas, podem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento da infecção e aos efeitos negativos da malária falciparum, e as multigestas expostas à malária em gestações prévias podem possuir relativa proteção (NOSTEN et al., 1991; ISMAIL et al., 2000; BRABIN, 2004; ROGERSON et al., 2007). O efeito protetor da paridade é observado principalmente em regiões de alta transmissão (MENENDEZ, 2006), onde há maior probabilidade da gestante ser exposta à malária na primeira gestação. A associação entre paridade e proteção à malária falciparum está relacionada com a presença de anticorpos capazes de inibir a citoadesão de hemácias parasitadas nos tecidos placentários (STAALSOE et al., 2004). Anticorpos contra VAR2CSA, que são anticorpos encontrados somente em mulheres, e dependentes do número de gestações prévias, possuem conhecida função protetora para desfechos gestacionais em gestantes sujeitas à infecção por *P. falciparum* (SALANTI et al., 2004; NDAM et al., 2015).

Os mecanismos de proteção associados à paridade para malária vivax não são tão claros como para malária falciparum. Porém, já é reconhecido que primigestas também são mais vulneráveis aos efeitos da malária vivax na gestação, tendo maior risco de desenvolver a doença, e maior risco de anemia, prematuridade e baixo peso ao nascer (NOSTEN et al., 1999; BÔTTO-MENEZES et al., 2015; MOORE et al., 2017a). A presença de anticorpos para proteínas VIR de *P. vivax* foi associada positivamente com peso ao nascer (REQUENA et al., 2016). A idade da gestante, que comumente está associada com tempo de exposição à malária e com desenvolvimento de resposta humoral (KING et al., 2008; SOUZA-SILVA et al., 2010), também já foi relacionada com melhora nos desfechos gestacionais (BÔTTO-MENEZES et al., 2015), e a presença de anticorpos para PvDBP em gestantes foi associada positivamente com peso ao nascer (REQUENA et al., 2017). Há indicação, portanto, de que não somente a imunidade associada à paridade possui efeito protetor, mas que também a imunidade adquirida

ao longo de exposições repetidas ao parasito exerce papel importante na proteção contra os efeitos negativos da malária na gestação (DESAI et al., 2007).

Os níveis de transmissão estão associados com a intensidade dos efeitos da malária para a saúde materno-fetal. Acredita-se que em regiões de baixa a intermediária transmissão, onde as gestantes, independentemente da paridade ou idade, não possuem imunidade clínica adquirida à doença, o risco de desenvolvimento de malária grave seja maior do que em regiões de alta endemicidade (DESAI et al., 2007). O mesmo acontece com o risco de natimortalidade e prematuridade, que é maior nas regiões de baixa a intermediária transmissão do que nas regiões de alta transmissão (DESAI et al., 2007; MOORE et al., 2017b). Os efeitos mais graves da malária na gestação em regiões com menor endemicidade é uma questão importante a ser considerada ao serem desenhadas as políticas de controle e eliminação da doença porque, com a diminuição dos níveis de transmissão, existe a possibilidade de agravamento dos efeitos dessa infecção para a saúde materno-fetal (MOORE et al., 2017b).

Há indicação de que o risco de desenvolver infecção por *Plasmodium* assintomática seja maior em gestantes do que em mulheres não gestantes (KHAN et al., 2014). Apesar de serem silenciosas, essas infecções foram associadas com piora nos desfechos gestacionais, podendo aumentar o risco de anemia, aborto, prematuridade e nascimento de criança pequena para a idade gestacional (MCGREADY et al., 2012; MATANGILA et al., 2014; MOORE et al., 2017a). Além dos possíveis efeitos negativos das infecções assintomáticas para os desfechos gestacionais, esse tipo de infecção é um desafio para o controle da malária. Ainda que muitas vezes associadas à baixa parasitemia e menor infectividade para o mosquito, quando comparadas com infecções que apresentam sintomatologia clínica, as infecções assintomáticas são um reservatório de malária de longa duração e contribuem, portanto, para a transmissão da doença e para a manutenção da malária em regiões de baixa transmissão (ALVES et al., 2005; BARBOSA et al., 2014). Assim, as gestantes, além de serem um grupo de risco para os efeitos negativos da malária, podem ser um reservatório da doença (YANOW et al., 2016).

1.4.2 Malária congênita

A malária durante a gestação pode evoluir para malária congênita. Essa evolução é clinicamente rara nas regiões endêmicas e se caracteriza pela presença de estágios sanguíneos de plasmódios no sangue do cordão umbilical ou no sangue periférico do neonato. A prevalência de malária congênita diagnosticada por metodologia molecular em sangue de

cordão umbilical é bastante variável nas regiões endêmicas para malária. Nas Américas foram encontradas prevalências que variaram de 3,0% a 27,0% na Colômbia, 14,8% na Guatemala e 1,0% no Brasil (PIÑEROS-JIMÉNEZ et al., 2011; AGUDELO-GARCÍA et al., 2017; BARDAJÍ et al., 2017).

Em estudo realizado na Nigéria, onde a espécie predominante é *P. falciparum*, em 62,1% (n = 59) dos casos de malária congênita a infecção foi curada de forma espontânea nas primeiras 72h de vida sem apresentação de sintomas. Entre os casos sintomáticos, febre e recusa a se alimentar foram os principais sintomas (FALADE et al., 2007). Por possuir manifestações clínicas inespecíficas, é comum que a malária congênita seja confundida com sepse neonatal, levando à administração desnecessária de antibióticos (BHATIA et al., 2016; GÜLAŞĐ; ÖZDENER, 2016). Apesar da maioria das infecções congênitas serem silenciosas, casos graves de malária congênita e neonatal foram atribuídos tanto a infecções por *P. vivax* como por *P. falciparum* (PIÑEROS-JIMÉNEZ et al., 2008; PIÑEROS-JIMÉNEZ et al., 2011; BHATIA et al., 2016; GÜLAŞĐ; ÖZDENER, 2016; OLUPOT-OLUPOT et al., 2018).

O caráter predominantemente assintomático da malária congênita pode estar relacionado com a presença de hemoglobinas fetais (HbF) - as hemácias com HbF quando parasitadas parecem ser menos citoaderentes do que aquelas com hemoglobinas não fetais, de forma a limitar a gravidade da infecção por *P. falciparum* (AMARATUNGA et al., 2011) - e com a presença de anticorpos adquiridos na vida intrauterina por passagem transplacentária (DOBBS et al., 2016). A passagem transplacentária de anticorpos acontece mesmo em regiões de baixa transmissão de malária, onde há cocirculação de *P. falciparum* e *P. vivax*, e onde o tratamento da doença é efetivo (CHARNAUD et al., 2016). Acredita-se que sejam esses anticorpos os principais responsáveis pela baixa incidência de malária falciparum clínica nos primeiros seis meses de vida (RILEY et al., 2001). Para *P. vivax* a proteção contra a malária clínica nos primeiros seis meses de vida não é uma questão resolvida. Em regiões endêmicas para *P. vivax* e *P. falciparum* do Sudeste Asiático, *P. vivax* é a espécie mais prevalente em crianças de até dois anos (KARYANA et al., 2008; POESPOPRODJO et al., 2009), tendo sido considerada uma importante causa de morbidade nos três primeiros meses de vida em Papua, na Indonésia (POESPOPRODJO et al., 2009).

1.4.3 Prevenção e tratamento da malária associada à gestação no Brasil

O Ministério da Saúde recomenda, desde 2006, que seja feita busca ativa de malária por exame de gota espessa, independente de sintomas, em todas as consultas pré-natais e no momento do parto, em gestantes da Região Amazônica - são recomendadas pelo menos seis consultas de pré-natal ao longo da gestação (BRASIL, 2014a; MARCHESINI et al., 2014). O Ministério da Saúde preconiza, ainda, que as gestantes recebam orientações sobre os efeitos negativos da malária associada à gestação, e sobre a importância de buscar assistência de saúde nos casos de sintomatologia que indiquem a possibilidade de malária. A busca ativa deve ser notificada como casos negativos e positivos de malária (SIVEP), e a condição de gestante deve ser preenchida adequadamente (BRASIL, 2014b).

A política nacional de tratamento para malária recomenda às gestantes diagnosticadas com infecção por *P. falciparum* os seguintes esquemas de tratamento: quinina associada à clindamicina, nos casos diagnosticados no primeiro trimestre de gestação, e combinação de artemeter e lumefantrina ou artesunato mefloquina, para os casos diagnosticados no segundo e terceiro trimestre de gestação. Há contraindicação de doxiciclina, e nos casos de malária grave no primeiro trimestre de gestação, com risco iminente de vida da mãe, pode ser prescrita artemisinina. Para infecções por *P. vivax*, o tratamento deve ser feito somente com cloroquina. Caso houver novo caso de malária vivax diagnosticado, deve ser prescrito novo tratamento com cloroquina seguido de esquema de cloroquina semanal profilática, por doze semanas. O Ministério da Saúde recomenda que seja feito acompanhamento da adesão ao tratamento (BRASIL, 2014b).

A terapia preventiva para gestantes (IPTp), com sulfadoxina-pirimetamina, não foi implementada no Brasil, e não é política de saúde recomendada pela OMS para as regiões endêmicas para malária fora do continente africano (WHO, 2017). A possibilidade de *P. vivax* desenvolver resistência a esses medicamentos é conhecida (MARFURT et al., 2008). Além disso, há escassez de estudos epidemiológicos que avaliem a implementação de IPTp em regiões onde há cocirculação de *P. vivax* e de *P. falciparum* (UNGER et al., 2015; ROGERSON; UNGER, 2016).

Com o intuito de evitar os riscos do uso de primaquina em populações consideradas vulneráveis à anemia hemolítica, gestantes não devem receber esse medicamento como tratamento de infecção por *P. vivax* em hipótese alguma (BRASIL, 2010). Porque a primaquina é o único medicamento capaz de tratar os hipnozoítos e, ainda, porque a recomendação do

tratamento profilático com cloroquina começa a partir do segundo episódio de malária vivax, gestantes são um grupo de risco para episódios repetidos de malária vivax. Além dos episódios repetidos agravarem os efeitos da malária ao longo da gestação para a saúde materno-infantil (LOPEZ-PEREZ et al., 2016; MOORE et al., 2017a), o tratamento desses episódios é um gasto importante para o sistema de saúde brasileiro, mesmo em regiões de baixa transmissão de malária (BÔTTO-MENEZES et al., 2016).

Todos os anos são diagnosticados no Brasil por microscopia entre 6.000 e 9.000 casos de malária em gestantes (MARCHESINI et al., 2014). No entanto, não é conhecida a incidência de malária ao longo da gestação, em parte porque, apesar da recomendação do Ministério da Saúde de que todas as gestantes da Amazônia, com sintomas ou não, sejam testadas para a malária, o diagnóstico laboratorial da doença não foi plenamente incorporado à rotina de cuidado pré-natal naquela região. Em estudo realizado nas cidades de Manaus, Presidente Figueiredo e Porto Velho, foi estimado que somente 6,8% das gestantes dessas cidades sejam testadas para malária durante o pré-natal (LUZ et al., 2013). Nesse mesmo estudo, foi observado que o tratamento de 10,2% dos casos de malária nas gestantes não seguiu as indicações preconizadas pelo Ministério da Saúde (LUZ et al., 2013).

Certamente o número de mulheres com malária ao longo da gestação é subnotificado, seja devido a casos assintomáticos, a imprecisões diagnósticas ou a falhas na notificação.

1.5 LACUNAS NO CONHECIMENTO

Apesar de muito da epidemiologia e consequências da malária durante a gestação serem conhecidas, sobretudo a causada por *P. falciparum* no continente africano, há lacunas importantes que dificultam o controle desse problema de saúde pública. Dentre elas estão a ausência de uma estimativa global consolidada da morbidade e mortalidade maternas decorrentes da malária, e a falta de conhecimento preciso sobre a incidência e implicações clínicas da malária vivax durante a gestação (DESAI et al., 2007; MUELLER et al., 2009; BARDAJÍ et al., 2017). Ao longo do ano de 2007, estima-se que 92,9 milhões de gestantes estiveram sob risco de infecção por *P. vivax* (DELLICOUR et al., 2010). Mesmo com tantas gestantes sob risco de malária vivax no mundo, somente no ano de 2015, em estudo conduzido em Bikaner, na Índia, e em Manaus, no Brasil, a gravidez foi considerada um fator de risco para gravidade e para morte por malária causada por *P. vivax* (SIQUEIRA et al., 2015). Para entendimento do impacto da malária durante a gestação para a saúde materna, fetal e infantil, e

também para a manutenção da doença em regiões de baixa transmissão, é fundamental que sejam feitas mais investigações em áreas endêmicas fora do continente africano, onde os estudos são mais escassos e onde há predominância de *P. vivax*. Além disso, é fundamental que as implicações de infecção por *P. vivax* sejam investigadas em diferentes ambientes endêmicos, em regiões com populações e comorbidades distintas (COSTA et al., 2012).

Neste trabalho foram avaliados os fatores associados com o desenvolvimento da malária ao longo da gestação, e as implicações da infecção por *Plasmodium* no momento do parto ou da malária clínica ao longo da gestação para o crescimento fetal e nível de hemoglobina materna no momento do parto, em uma região de alta endemicidade para a doença, onde há cocirculação de *P. falciparum* e *P. vivax*, na Amazônia Brasileira. Sob o olhar de que as áreas endêmicas para a malária possuem ecologia, parasitos e hospedeiros diferentes, esse trabalho pretende contribuir para o conhecimento das implicações da malária vivax para a saúde materno-fetal. No âmbito local, pretende-se levantar possíveis falhas na atenção à saúde das gestantes em áreas endêmicas para a malária no Brasil.

2 OBJETIVOS

Avaliar os fatores associados com o desenvolvimento da malária ao longo da gestação, e as implicações da exposição à malária para o crescimento fetal e nível de hemoglobina materna no momento do parto, no município de Cruzeiro do Sul, uma região de alta endemicidade da doença na Amazônia Ocidental Brasileira.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a prevalência de infecção por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* no momento do parto e de malária durante a gestação de parturientes da maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá, em Cruzeiro do Sul, no Estado do Acre;
2. Estimar a prevalência de malária congênita em filhos de parturientes da maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá;
3. Investigar fatores sociodemográficos associados ao diagnóstico de malária durante a gestação;
4. Avaliar o efeito da malária ao longo da gestação para o crescimento fetal e nível de hemoglobina materna no momento do parto em Cruzeiro do Sul.

3 METODOLOGIA

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A cidade de Cruzeiro do Sul está situada na região do Vale do Alto Juruá, no Estado do Acre - latitude 7°37'51"S, longitude 72°40'12"O. É o segundo maior município do Acre, possui área de 8.779,438 km² e população estimada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2015 de 81.519 pessoas. A 710 km da capital, Rio Branco, o município de Cruzeiro do Sul faz fronteira com o Estado do Amazonas, com o Peru e com as cidades acreanas de Tarauacá, Rodrigues Alves, Porto Walter e Mâncio Lima.

Em Cruzeiro do Sul, aproximadamente 70,4% da população reside em área urbana, sendo que somente 12,7% dos domicílios possuem esgotamento sanitário adequado (IBGE, 2010). A taxa de escolarização entre crianças de 6 a 14 anos está entre as mais baixas do Brasil, tendo sido estimada, em 2010, em 94,9%, o que coloca esse município na posição 5.043 entre as 5.570 cidades brasileiras avaliadas (IBGE, 2010). O Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) - calculado a partir de três indicadores de desenvolvimento humano: longevidade, educação e renda - foi estimado em 2010 em 0,664 – índice maior que 0,800 é considerado muito alto, de 0,700 a 0,799, alto, de 0,600 a 0,699, médio, de 0,500 a 0,599, baixo, e menor que 0,499 muito baixo (IBGE, 2010).

No que se refere à malária, a região do Vale do Alto Juruá é um dos principais focos da doença no país. Cruzeiro do Sul é considerado um município de alto risco para malária: IPA de 171,0 em 2015 (BRASIL, 2016b) e de 231,9 em 2016 (BRASIL, 2017), tendo sido responsável por 15,1% dos casos de malária notificados no Brasil no ano de 2016 (BRASIL, 2018). Nessa região, aproximadamente 80% dos casos de malária são notificados como infecções por *P. vivax*, e 20% como infecções por *P. falciparum* ou infecções mistas de *P. falciparum* e *P. vivax* (Brasil, 2018).

3.1.1 Atenção à saúde materna em Cruzeiro do Sul

A atenção pré-natal em Cruzeiro do Sul é parte do programa Estratégia Saúde da Família (ESF). Aproximadamente 200 agentes comunitários compõem 25 equipes de Saúde da Família (eSF) da área urbana e 11 eSF da área rural, sendo uma delas caracterizada como Equipe de

Saúde da Família Fluvial (eSFF). No que se refere ao atendimento pré-natal na rede privada, no ano de 2015 havia cinco médicos obstetras que faziam atendimento particular na cidade.

Estima-se que mais de 95% dos partos do município de Cruzeiro do Sul sejam realizados no Hospital da Mulher e da Criança do Juruá (BRASIL, 2014 – dados não publicados), cuja maternidade é responsável por todos os partos hospitalares de Cruzeiro do Sul, além de atender os demais municípios localizados no Vale do Alto Juruá. Essa maternidade conta com leitos de ginecologia, leitos de pré-parto, parto e pós-parto, redes - para parturientes indígenas -, oito leitos com abordagem Mãe Canguru, leitos de recuperação pós-anestésica, dois leitos de UTI materna, dez de UTI neonatal, quatro salas cirúrgicas, sala de curetagem, consultório de avaliação e banco de leite.

Nos anos de 2015 e 2016 foram registrados, respectivamente, 1.839 e 1.632 nascimentos vivos no município. A taxa de mortalidade infantil média é de 12,11 a cada 1.000 nascidos vivos (IBGE, 2014).

3.2 DESENHO DO ESTUDO

Este é um estudo observacional aninhado à coorte do projeto Materno-Infantil no Acre: coorte de nascimentos da Amazônia Ocidental Brasileira (MINA Brasil). O MINA-Brasil é constituído por um conjunto de pesquisas epidemiológicas sobre condições de saúde e nutrição materno-infantil na cidade de Cruzeiro do Sul. O MINA-Brasil começou em 2015 e foi estruturado da seguinte forma: (a) acompanhamento de gestantes da região urbana de Cruzeiro do Sul, com realização de ultrassonografia (USG), questionário estruturado, coleta de amostras sanguíneas e de dados antropométricos; (b) questionário estruturado e coleta de amostras sanguíneas e de cordão umbilical das parturientes da maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá, com inclusão das residentes da zona rural que não participaram do acompanhamento pré-natal junto à equipe do projeto Mina-Brasil (etapa a), sendo esta a linha de base do acompanhamento dos nascidos vivos; (c) acompanhamento dos nascidos vivos residentes da zona urbana.

Para a realização deste trabalho foram utilizados os dados coletados durante o acompanhamento das gestantes da região urbana de Cruzeiro do Sul, os dados e amostras coletados das parturientes na maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá, e foi recuperado o histórico de casos de malária notificados no Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (SIVEP – Malária) ao longo da gestação.

3.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Entre julho de 2015 e junho de 2016, 1.865 gestantes, atendidas nos postos de saúde da área urbana da cidade de Cruzeiro do Sul ou na maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá, residentes em Cruzeiro do Sul, foram convidadas a participar do estudo.

Os critérios de inclusão das gestantes na pesquisa foram: ter concordado de forma voluntária em participar do estudo e ter amostras de sangue materno colhidas na maternidade.

3.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). O protocolo de pesquisa foi inicialmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP), e posteriormente pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP – ICB.

3.5 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS

As amostras e os dados utilizados neste estudo foram coletados por membros do projeto MINA-Brasil, que são estudantes e profissionais da área da saúde da Universidade Federal do Acre e da USP. As amostras de sangue venoso materno e de cordão umbilical foram obtidas por profissionais treinados da maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá.

As balanças da maternidade usadas para aferição do peso ao nascer dos recém-nascidos tiveram a calibração periodicamente verificada. Para medir o comprimento ao nascer foi utilizada fita métrica. A equipe do hospital responsável pela aferição antropométrica dos recém-nascidos recebeu treinamento para coleta dessas medidas. Os níveis de hemoglobina (Hb) maternos no momento do parto foram recuperados dos registros hospitalares da maternidade, a qual utiliza a seguinte metodologia para o cálculo: amostras sanguíneas são coletadas logo após a admissão na maternidade e o nível de Hb é calculado com contador de células automatizado Labtest® SDH-20 (Lagoa Santa, Brasil).

Tablets foram utilizados para a entrada de dados durante o trabalho de campo, com rotinas de verificação da qualidade e acurácia da entrada de dados. Verificações de consistência e intervalos possíveis para respostas construídas na rotina de entrada de dados verificaram

automaticamente as informações, sempre que possível. Toda a mesclagem, gestão e análise de dados foram feitas utilizando-se o *software* SPSS 17.0 ou Stata 13.0.

Os questionários completos estão disponíveis no Apêndice B desse trabalho.

3.5.1 Acompanhamento de gestantes da região urbana de Cruzeiro do Sul

Gestantes inscritas na assistência pré-natal da ESF residentes da área urbana de Cruzeiro do Sul foram localizadas entre fevereiro de 2015 e fevereiro de 2016 em parceria com profissionais da eSF. Foram convidadas a participar do estudo aquelas que seguiam os seguintes critérios de inclusão: idade gestacional (IG) inferior a 20 semanas no momento do rastreamento - calculada de acordo com a data da última menstruação (DUM) -, residência fixa em Cruzeiro do Sul e intenção de parir na maternidade desse município. As gestantes que aceitaram participar do estudo receberam visita domiciliar da equipe MINA-Brasil, quando foi aplicado questionário sócio-demográfico e de histórico de saúde, e agendada a primeira avaliação clínica programada para acontecer entre a 16^a e 20^a semana gestacional - calculada a partir do DUM.

Na primeira avaliação clínica foi realizado o exame USG por médicos ultrassonografistas ou obstetras da equipe MINA-Brasil. O principal objetivo da USG foi estimar a IG segundo parâmetros biométricos, e para isso foi feita a aferição de diâmetro biparietal e comprimento femoral fetais. Durante a avaliação foram coletadas amostras de sangue venoso, dados antropométricos e informações comportamentais como consumo alimentar, tabagismo e ingestão de bebidas alcoólicas. Com o intuito de averiguar a qualidade dos questionários aplicados nas visitas domiciliares foi selecionada aleatoriamente uma subamostra, correspondente a 10% do total de gestantes que responderam ao questionário, que receberam novamente o mesmo questionário.

A segunda avaliação clínica aconteceu entre a 24^a e a 28^a semana gestacional - calculadas com base nos parâmetros da primeira USG ou do DUM, oportunidade em que foi novamente feita USG, coletadas amostras de sangue venoso, dados antropométricos e as informações comportamentais recolhidas durante a primeira avaliação.

3.5.2 Parturientes da maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá

Esta etapa teve início em julho de 2015, quando começaram os partos das primeiras gestantes que participaram do acompanhamento pré-natal com a equipe do MINA-Brasil, e teve duração de um ano, tendo sido finalizada em junho de 2016. Durante esse período foram

convidadas a participar do estudo todas as mulheres residentes em Cruzeiro do Sul independentemente de terem residência na zona rural ou urbana, ou de terem participado do acompanhamento pré-natal com a equipe MINA-Brasil. Das mulheres que aceitaram participar do estudo foram registradas tanto as informações sobre os nascimentos como sobre os abortos recuperadas dos prontuários, tendo sido coletadas amostras de sangue venoso materno e de cordão umbilical, e feitos questionários estruturados dentro das primeiras 12 horas do pós-parto. Através dos questionários estruturados e dos prontuários foram colhidas (a) informações referentes à mãe: intercorrências gestacionais, peso gestacional, assistência pré-natal e, para as que não participaram do acompanhamento pré-natal do projeto MINA-Brasil, foram coletadas informações sociodemográficas e de histórico obstétrico; (b) informações referentes aos recém-nascidos: sexo, dados antropométricos, Índice de Ápgar e informações sobre intercorrências neonatais.

Foram coletados do banco de dados da maternidade as informações sobre o desfecho gestacional - nascido vivo, aborto ou natimorto - de todas as gestantes que seriam elegíveis para participar do estudo, independentemente de terem concordado em participar do estudo ou não. Essa informação foi fundamental para se entender a população que fez parte do estudo.

3.5.3 Busca dos casos de malária notificados pelo SIVEP ao longo da gestação

Casos de malária diagnosticados por microscopia ao longo da gestação (malária antenatal) e nos dois meses seguintes ao parto foram identificados através do cruzamento do banco de dados do projeto MINA-Brasil com o banco de dados do SIVEP, cedido pelo Programa Nacional de Controle de Malária do Ministério da Saúde. No banco de dados do SIVEP estão disponíveis as seguintes informações: nome e idade da paciente, nome da mãe da paciente, data do exame, município de notificação, unidade notificante, município e provável local de infecção, resultado do exame, quantidade de cruces, se a paciente é gestante, presença de sintomas e esquema de tratamento. É importante ressaltar que a malária no Brasil é uma doença de notificação obrigatória, e os medicamentos antimaláricos são gratuitos e acessíveis somente através do SUS. Portanto, espera-se que todos os casos de malária diagnosticados no país sejam notificados.

A busca das gestantes participantes do projeto no banco de dados do SIVEP foi feita através de similaridade entre nomes, e a ferramenta utilizada foi o programa *MATLAB* (*Matrix Laboratory*). O período compreendido na busca foi ajustado para cada gestante, tendo sido

utilizado, como critério de delimitação do tempo, a idade gestacional no momento do parto, mais uma semana. Foram considerados elegíveis para pareamento os casos notificados em que as pacientes possuíam idade igual a mais ou menos três anos a idade da gestante referência no momento do exame. No processo de localização foram usadas três funções: *strcmp*, *strmatch*, e *strnearest*.

A primeira função aplicada, *strcmp*, fez a busca por nomes idênticos. Caso o nome da gestante não tenha sido localizado, a função *strmatch* foi utilizada.

Strmatch busca por nomes com início idênticos. Assim, por exemplo, para a gestante *Maria das Graças Lima*, os seguintes nomes na planilha do SIVEP seriam localizados: *Maria das Graças Lima Diniz*; *Maria das Graças Lima Marques* e *Maria das Graças Lima Santos*.

A função *strnearest* foi aplicada para as gestantes que não foram localizadas na lista do SIVEP com o uso de *strcmp* e *strmatch*. Esta função busca por nomes similares, não necessariamente idênticos. Foram admitidas nove divergências na quantidade de substituição, eliminação e inserção de caracteres para os casos notificados no SIVEP como gestantes, e cinco divergências para os demais casos.

Foi feita, então, a análise manual de cada nome localizado, para que fossem eliminados os pareamentos julgados incorretos. Além dos casos de malária, do banco de dados do SIVEP foram recolhidas informações sobre o esquema de tratamento disponibilizado, e se a condição de gestante foi notificada corretamente.

A busca dos recém-nascidos diagnosticados com malária congênita no banco de dados do SIVEP foi feita através do nome materno e, com exceção do critério de idade, seguiu-se a mesma metodologia da busca das gestantes já descrita aqui.

3.6 CÁLCULO DO ÍNDICE DE RIQUEZA

O índice de riqueza foi estimado pela análise dos componentes principais de forma separada para as gestantes que participaram do acompanhamento pré-natal junto à equipe MINA-Brasil e para as mulheres que foram convidadas a participar do estudo na maternidade. Para as gestantes que participaram do acompanhamento, o primeiro componente principal explicou 18,86% da variação entre as famílias, e foi usado para derivar pesos para cada item considerado dentro do domicílio: televisão (0,13), som (0,10), computador (0,36), internet (0,34), DVD (0,19), televisão por assinatura (0,23), fogão (0,10), geladeira (0,14), ferro elétrico (0,36), micro-ondas (0,30), sofá (0,22), linha de telefone fixo (0,24), telefone celular (0,18),

bicicleta (0,06), moto (0,27), carro (0,30), posse de terras (-0,00) e criação de gado (-0,00). Para as participantes que não participaram do acompanhamento e que foram convidadas a participar do estudo na maternidade, o primeiro componente principal explicou 22,76% da variação entre os domicílios e os pesos derivados foram: televisão (0,21), som (0,10), computador (0,32), internet (0,31), DVD (0,20), televisão por assinatura (0,25), fogão (0,13), geladeira (0,24), ferro elétrico (0,32), micro-ondas (0,28), sofá (0,25), linha de telefone fixo (0,22), telefone celular (0,23), bicicleta (0,05), moto (0,21), carro (0,27), posse de terras (-0,04) e criação de gado (-0,04). Os escores gerados foram somados para se estimar o índice de riqueza domiciliar.

3.7 DEFINIÇÕES CLÍNICAS

Neste estudo malária antenatal foi definida como qualquer detecção de *Plasmodium* através do exame de gota espessa que tenha sido notificada ao longo da gestação. Infecção por *Plasmodium* no momento do parto e malária congênita foram definidas como qualquer detecção de *Plasmodium* feita por diagnóstico molecular em amostras de sangue venoso materno, coletado no momento do parto, ou em sangue de cordão umbilical, respectivamente. Malária gestacional foi definida como qualquer detecção de *Plasmodium* no sangue materno, seja por exame de microscopia de gota espessa ao longo da gestação, ou por diagnóstico molecular no momento do parto.

Para aproximadamente um terço das participantes deste estudo a IG foi estimada com base em dados antropométricos obtidos por USG, realizada pela equipe do projeto MINA-Brasil entre a 12^a e a 20^a semanas de gestação. O seguinte esquema foi aplicado para definição da IG das gestantes que fizeram USG: (a) DUM - para as gestantes que relataram ciclos menstruais regulares, que não usavam contraceptivo hormonal antes da gestação, que possuíam informação precisa do mês e dia da última menstruação, e que a variação em relação à IG estimada com base nos dados recolhidos durante a USG tenha sido menor ou igual a sete dias; (b) USG - para as gestantes que não puderam informar com precisão a data da última menstruação, ou que relataram ciclos menstruais irregulares ou uso de contraceptivos hormonais, ou quando a diferença entre a estimativa baseada nos dados da USG e do DUM tenha ultrapassado sete dias (WYLIE et al., 2013). Para as participantes que não tinham dados da USG disponíveis, o cálculo foi baseado no DUM anotado no cartão da gestante ou referido pela mãe, nessa ordem de prioridade.

Aborto foi definido como morte fetal antes da 22ª semana de gestação. Natimorto foi definido como morte fetal na 22ª semana de gestação ou nas semanas posteriores. Os recém-nascidos que nasceram antes da 37ª semana de gestação foram considerados prematuros. Baixo peso ao nascer foi definido como peso inferior a 2.500g, independentemente da idade gestacional do recém-nascido. Os recém-nascidos que tiveram peso menor que o 10º percentil de referência para idade gestacional e sexo, com base no *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century* (INTERGROWTH-21st) foram considerados pequenos para a idade gestacional.

Anemia materna foi definida como concentração de hemoglobina menor que 11g/100mL no momento do parto; concentração de hemoglobina menor que 7g/100mL foi considerada anemia grave.

3.8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Foi feito diagnóstico molecular por qPCR para *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* das amostras de sangue venoso materno coletado no momento do parto, e também das amostras de sangue de cordão umbilical.

O diagnóstico molecular foi realizado em duas etapas. Inicialmente foi feita a triagem das amostras através de diagnóstico gênero específico com SYBR Green (Fermentas, Burlington, Canada). As amostras positivas foram, então, submetidas ao diagnóstico espécie específico com sondas de hidrólise TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para as duas reações de diagnóstico, gênero específico e espécie específico, foram utilizados iniciadores para o gênero *Plasmodium* que amplificam fragmentos de 157 a 165 pares de bases do gene 18S rRNA das três espécies de interesse (ROUGEMONT et al., 2004):

Iniciadores

Plasmodium sp. 5' GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA 3' (Anterior)

5' AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA 3' (Reverso)

Para a realização do diagnóstico gênero específico foram aplicados em cada reação 5 µl de amostra, 7,5 µl de 2× Maxima SYBR Green qPCR master mixture, 100 nM de cada um dos

iniciadores e água para completar 20 µl. As condições de amplificação foram as indicadas para SYBR Green. As etapas de desnaturação e de anelamento foram repetidas 40 vezes.

Para o diagnóstico espécie específico foram utilizadas as seguintes sondas de hidrólise TaqMan (ROUGEMONT et al., 2004):

Sondas

<i>P. vivax</i>	5' VIC - AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT - QSY 3'
<i>P. falciparum</i>	5' FAM - AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT - QSY 3'
<i>P. malariae</i>	5' NED - CTATCTAAAAGAAACACTCAT - MGB 3'

Em cada reação foram aplicados 5 µl de amostra, 10 µl de TaqMan Universal Master Mix II, 100 nM de cada um dos iniciadores, sonda a 80 nM e água para completar 20 µl. As condições de amplificação foram as indicadas para TaqMan. As etapas de desnaturação e de anelamento foram repetidas 45 vezes.

Para construção da curva de concentração e controle positivo, foram desenhados, para cada espécie de plasmódio, plasmídeos contendo as regiões amplificadas pelos iniciadores descritos acima (Anexo 1).

O DNA plasmidial foi linearizado com a enzima de restrição PvuI (10 Uµl, *New England Biolabs*) de acordo com as recomendações do fabricante. A digestão do plasmídeo foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

A purificação do DNA linearizado foi feita com Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (*GE healthcare*), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA linearizado e purificado foi quantificado no aparelho *NanoDrop*. A estimativa do número de cópias por µl para construção da curva de concentração foi feita a partir da quantificação do DNA plasmidial linearizado e purificado. Para quantificação a seguinte fórmula foi utilizada - onde 649 é peso molecular médio de um par de base (pb) de DNA em g/mol e $6,022 \times 10^{23}$ é o número de moléculas em 1 mol (número de Avogadro): $(\text{ng}/\mu\text{l} / \text{n}^\circ \text{ pb do plasmídeo} \times 649) \times 6,022 \times 10^{23} = \text{n}^\circ \text{ cópias}/\mu\text{L}$.

Todas as reações foram preparadas em placas do tipo MicroAmp 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) e realizadas no termociclador Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foram feitos controles negativos, contendo

todos os reagentes de amplificação com exceção da amostra de DNA, em todas as placas deste estudo. A sensibilidade do diagnóstico foi de 2 a 5 parasitos por μl de sangue.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados desta pesquisa foram processados no programa Stata version 14.1 (StataCorp, College Station, TX) e analisados com o programa Stata ou SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Para estimativa de viés de seleção de população foram aplicados os testes de χ^2 , para variáveis categóricas ou, para variáveis contínuas, o teste *t de Student*. Significância estatística foi definida como valor de $p < 0,05$.

Modelos de regressão logística múltiplos foram construídos para avaliar a associação entre determinantes socioeconômicos, ambientais e biológicos com os seguintes desfechos: malária antenatal, infecção por *Plasmodium* no momento do parto e malária na gestação. As seguintes variáveis foram incluídas nos modelos: idade estratificada em três categorias (13 -20, 21 - 30 e > 30 anos); paridade (0 = secundigesta ou multigesta, 1 = primigesta); anos de escolaridade materna, estratificado em quatro categorias (0, 1-5, 6-10, e >10 anos); índice de riqueza, estratificado em quintis em ordem crescente (primeiro quintil representa a parcela 20% mais pobre), área de residência (0 = urbana, 1 = rural) e número de visitas de pré-natal (variável contínua). Foram retidas no modelo as variáveis que se associaram com o desfecho com significância de ao menos 15% ou que foram relevantes com base na literatura. Foram construídos modelos separados com distinção e sem distinção de espécie de parasito diagnosticada.

Modelos de regressão linear múltiplos foram construídos para avaliar a associação entre malária antenatal ou infecção por *Plasmodium* no momento do parto, com os desfechos de nível de hemoglobina materna no parto, peso e comprimento ao nascer. Foram construídos modelos separados para cada um dos desfechos. A seleção de variáveis independentes seguiu modelo hierárquico de determinação de malária descrito por BARBOSA et al. (2014) a partir da proposta conceitual de VICTORA et al. (1997). Dessa forma, foi possível identificar variáveis de potencial confusão, e fazer o ajuste das variáveis estudadas conforme o nível de determinação em que estas se encontram no modelo hierárquico. Para as análises de peso e comprimento ao nascer feitas em escore z, usou-se como base os parâmetros do INTERGROWTH-21st.

No modelo hierárquico, os determinantes mais distais incluíram as seguintes variáveis: idade, estratificada em duas categorias (13-20 anos e > 20 anos); paridade (0 = secundigesta ou multigesta, 1 = primigesta); sexo do recém-nascido (0 = feminino, 1 = masculino); anos de escolaridade materna (variável contínua); índice de riqueza (variável contínua); e área de residência (0 = urbana, 1 = rural). Os determinantes mais proximais incluíram: uso de álcool e cigarro no período pré-natal; número de visitas pré-natal (variável contínua); tipo de parto (0 = vaginal, 1 = cesariano); necessidade de transfusão sangüínea ao longo da gestação (para os modelos do desfecho hemoglobina materna); comorbidades autorreferidas (diabetes, infecção urinária e hipertensão crônica ou gestacional); notificação de malária antenatal ou diagnóstico positivo para *Plasmodium* no momento do parto. Variáveis associadas com o desfecho de interesse com significância de ao menos 15% foram mantidas nos modelos finais. Permaneceram nas análises as participantes que possuíam informação para todas as variáveis. No modelo final ajustado, o valor de B (coeficiente de regressão) foi utilizado para indicar a associação da exposição com o desfecho de interesse.

4 RESULTADOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Entre as 1.865 gestantes convidadas a participar desta pesquisa - gestantes elegíveis -, 1.538 (82,5%) concordaram em participar do estudo, foram entrevistadas e tiveram seus dados recuperados dos prontuários da maternidade. Entre as gestantes que concordaram em participar do estudo, 1.180 (63,3% das gestantes elegíveis) tiveram amostra de sangue venoso coletada no momento do parto, e 637 (34,1% das gestantes elegíveis) tiveram amostra de cordão umbilical colhida.

Ao todo 1.180 gestantes participaram das análises de fatores associados ao desenvolvimento de malária gestacional. As análises da associação entre ocorrência de malária gestacional e os desfechos gestacionais restringiram-se às 1.140 gestantes que tiveram filhos nascidos vivos não gêmeos, e seus filhos. Entre as participantes do estudo 38,8% eram primigestas, 97,9% tiveram ao menos uma consulta pré-natal, sendo que 56,5% tiveram mais de sete consultas, 43,6% tiveram parto cesariano e 34,6% eram residentes da zona rural.

O fluxograma do estudo, com as informações de quantidade de participantes, de amostras utilizadas, e de perda de seguimento é apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma do estudo

Entre junho de 2015 e julho de 2016, 1.865 gestantes, atendidas nos postos de saúde da área urbana da cidade de Cruzeiro do Sul ou na maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá, foram convidadas a participar do estudo. As gestantes participantes do estudo e as perdas de seguimento são mostradas na figura.

4.1.2 Perdas

As participantes deste estudo ($n = 1.180$), quando comparadas com as gestantes que seriam elegíveis para participar da pesquisa mas que não participaram ($n = 685$), tiveram maior probabilidade de ter filhos nascidos vivos - entre as participantes houve 9 natimortos e 23 abortos, enquanto que entre as não participantes houve 7 natimortos e 89 abortos ($P = < 0,001$). Por esse motivo as análises de associação entre malária gestacional e os desfechos gestacionais restringiram-se aos nascidos vivos.

A Tabela 1 mostra a comparação entre as gestantes que aceitaram participar do estudo mas que não fizeram parte das análises porque não tiveram amostra sanguínea colhida no parto disponível ($n = 346$), e as gestantes que fizeram parte da população analisada na pesquisa

(n = 1.180). A única diferença com significância estatística entre esses dois grupos foi a maior probabilidade das gestantes que participaram das análises reportarem consumo de álcool no período antenatal.

Tabela 1 – Comparação entre a população de estudo e a população que aceitou participar do estudo mas não foi incluída nas análises por falta de amostra sanguínea coletada no parto

(continua)

Variável	Participantes (N de gestantes com informação)	Não participantes (N de gestantes com informação)	P (χ^2)
Idade	(n = 1.178)	(n = 327)	0,59
13 - 20	380	96	
21-30	539	154	
>30	259	77	
Índice de riqueza (quinti)	(n = 1.180)	(n = 346)	
1 (mais pobre)	240	66	0,11
2	240	65	
3	219	86	
4	246	60	
5 (menos pobre)	235	69	
Área da residência	(n = 1.178)	(n = 327)	0,37
Urbana	770	205	
Rural	408	122	
Paridade	(n = 1.180)	(n = 346)	0,30
Primigesta	458	145	
Sexo recém-nascido	(n = 1.149)	(n 341)	0,21

Tabela 1 - Comparação entre a população de estudo e a população que aceitou participar do estudo mas não foi incluída nas análises por falta de amostra sanguínea coletada no parto

(continuação)

Variável		Participantes (N de gestantes com informação)	Não participantes (N de gestantes com informação)	<i>P</i> (χ^2)
	Feminino	576	184	
	Masculino	573	157	
Gêmeos		(n = 1.157)	(n = 343)	0,83
	Sim	8	2	
	Não	1149	341	
Fumo antenatal		(n = 1.180)	(n = 346)	
	Sim	52	16	0,86
	Não	1128	330	
Consumo de álcool antenatal		(n = 1.180)	(n = 346)	0,05
	Sim	206	45	
	Não	974	301	
Infecção urinária		(n = 1.178)	(n = 327)	0,14
	Sim	762	197	
	Não	416	130	
Diabetes		(n = 1.180)	(n = 346)	0,68
	Sim	20	7	
	Não	1160	339	
Hipertensão crônica		(n = 1.180)	(n = 346)	0,07
	Sim	132	51	
	Não	1048	295	

Tabela 1 - Comparação entre a população de estudo e a população que aceitou participar do estudo mas não foi incluída nas análises por falta de amostra sanguínea coletada no parto

(continuação)

Variável	Participantes (N de gestantes com informação)	Não participantes (N de gestantes com informação)	<i>P</i> (χ^2)
Malária antenatal	(n = 1.180)	(n = 346)	
Qualquer espécie	94	23	0,42
<i>P. falciparum</i>	28	9	0,81
<i>P. vivax</i>	66	14	0,26
Número de casos de malária	(n = 1.180)	(n = 346)	0,49
0	1086	323	
1	74	16	
>1	20	7	
Tipo de parto	(n = 1.157)	(n = 343)	0,43
Vaginal	652	185	
Cesareano	505	158	
Desfecho da gestação	(n = 1.180)	(n = 346)	0,39
Nascido vivo	1.148	340	
Natimorto	9	3	
Aborto	23	3	
Baixo peso ao nascer	(n = 1.148)	(n = 339)	0,10
Sim	78	32	
Não	1.070	307	

(conclusão)

4.2 MALÁRIA GESTACIONAL

Foram identificados no banco de dados do SIVEP 122 casos de malária ao longo da gestação, sendo 29 (23,8%) causados por *P. falciparum*, 91 (74,6%) por *P. vivax*, e 2 (1,6%) por ambas as espécies. Ao todo 94 (8,0%) gestantes tiveram malária antenatal, 20 (1,7%) tiveram mais de um caso de malária notificado ao longo da gestação, e 28 (2,4%) tiveram ao menos um caso de infecção por *P. falciparum* notificada. Entre os 122 episódios de malária localizados, 36 (29,5%) ocorreram no primeiro trimestre de gestação, 40 (32,8%) no segundo trimestre, e 46 (37,7%) no terceiro trimestre.

A prevalência de infecção por *Plasmodium* no momento do parto nas participantes deste estudo foi de 7,5% (n = 89), sendo que 74 (83,1%) dos casos foram diagnosticados como *P. vivax*, 14 (15,7%) como *P. falciparum*, e um (1,1%) como infecção mista. Não foram encontradas amostras positivas para *P. malariae*. Três (3,4%) das gestantes diagnosticadas com infecção por *Plasmodium* no momento do parto - uma com *P. vivax* e duas com *P. falciparum* - tiveram malária notificada no SIVEP nas duas semanas anteriores ao parto, indicando que o diagnóstico pode ter detectado parasitemia residual pós-tratamento. Sete (7,9%) gestantes com diagnóstico positivo para *Plasmodium* no momento do parto, incluindo umas das gestantes que teve diagnóstico de malária vivax notificado poucos dias antes do parto, tiveram malária notificada nos dois meses seguintes ao parto. Todas as outras gestantes (89,9%) com diagnóstico molecular positivo para *Plasmodium* não tiveram casos de malária notificado nos dois meses seguintes ao parto, indicando que a imensa maioria dos casos diagnosticados de forma molecular foram assintomáticos e não foram tratados.

A prevalência de malária gestacional, seja malária antenatal ou infecção por *Plasmodium* no momento do parto, foi de 12,5% (n = 148).

4.3 DESFECHOS MATERNOS E DO RECÉM-NASCIDO

Entre as 1.180 participantes do estudo, 23 (1,9%) tiveram aborto, 9 (0,8%) tiveram filhos natimortos, e 1.148 (97,3%) tiveram filhos nascidos vivos, incluindo 8 (0,7%) gêmeos. Três recém-nascidos (0,3%) morreram durante a hospitalização pós-parto em decorrência de prematuridade extrema. Nenhuma parturiente morreu nos primeiros 42 dias do puerpério. O peso ao nascer dos 1.140 recém-nascidos nascidos vivos que participaram das análises deste estudo variou de 780 g a 5.060 g, com média de 3.222 g (desvio padrão de 509 g). O escore z

médio para peso ao nascer foi 0,09 (desvio padrão de 1,02), variando de -2,97 a 3,89 (Figura 4A). O escore z médio para comprimento ao nascer foi de 0,06 (desvio padrão de 1,08), variando de -3,26 a 4,00 (Figura 4B). Oitenta e seis (7,5%) dos nascidos vivos foram prematuros, 75 (6,6%) nasceram com baixo peso e 108 (9,5%) nasceram pequenos para a idade gestacional. A concentração de hemoglobina materna medida no parto variou de 5,4 g/100 mL a 18,8 g/100 mL, com média de 11,1 g/100 mL (desvio padrão de 1,4) (Figura 4C). Ao todo, 442 (40,1%) gestantes estavam anêmicas no momento do parto, sendo que 8 (0,7%) estavam com anemia grave.

Figura 4 – Distribuição de peso ao nascer, comprimento ao nascer e nível de hemoglobina materna no parto de gestantes que tiveram e que não tiveram malária antenatal

Distribuição de: A, peso ao nascer (escore z, $n = 1.140$); B, comprimento ao nascer (escore z, $n = 1.132$); C, nível de hemoglobina materna no momento do parto (g/100ml, $n = 1.101$); de gestantes que tiveram (preto) e que não tiveram (branco) ao menos um caso de malária notificada ao longo da gestação, entre junho de 2015 e julho de 2016 no município de Cruzeiro do Sul, Acre.

4.4 FATORES ASSOCIADOS À MALÁRIA GESTACIONAL

Morar em área rural foi o principal fator associado à malária gestacional na população deste estudo (Tabela 2 e Tabela 3, modelo ajustado). As gestantes do quintil mais rico foram as menos propensas a desenvolver malária gestacional, razão de *odds* ajustada de 0,39 (IC 95% 0,18 - 0,82, $p = 0,01$) (Tabela 3). Não foi encontrada associação entre paridade e malária gestacional. Entretanto, quando os modelos de regressão logística múltiplos foram estratificados em espécie de parasito e tipo de diagnóstico, ser primigesta foi condição associada à infecção por *P. falciparum* no momento do parto, razão de *odds* ajustada de 4,80 (IC 95% 0,99 - 23,17, $p = 0,05$).

Tabela 2 – Razão de *odds*, bruta, para associação entre características das participantes do estudo e o diagnóstico de malária antenatal ou de infecção por *Plasmodium* no parto

Característica	(número de gestantes)	Malária antenatal			Infecção por <i>Plasmodium</i> no parto		
		OR	(IC 95%)	P	OR	(IC 95%)	P
Idade (anos)							
13--20	(380)	1,00	(referência)		1,00	(referência)	
21--30	(539)	0,91	(0,58 -- 1,44)	0,70	0,52	(0,32 -- 0,82)	<0,01
>30	(259)	0,42	(0,21 -- 0,85)	0,01	0,27	(0,13 -- 0,56)	<0,0001
Primigesta							
sim	(458)	0,93	(0,60 -- 1,44)	0,74	1,60	(1,04 -- 2,46)	0,03
não	(722)	1,00	(referência)		1,00	(referência)	
Anos de escolaridade							
0	(56)	0,23	(0,03 -- 1,72)	0,15	2,13	(0,85—5,38)	0,11
1--5	(147)	1,45	(0,78 -- 2,70)	0,24	1,87	(0,96—3,63)	0,06
6--10	(413)	1,26	(0,80—1,99)	0,34	1,85	(1,13—3,04)	0,01
>10	(564)	1,00	(referência)		1,00	(referência)	
Índice de riqueza (quintil)							
1 (mais pobre)	(240)	1,00	(referência)		1,00	(referência)	
2	(240)	0,88	(0,49 -- 1,56)	0,66	0,57	(0,32 -- 1,00)	0,05
3	(219)	0,56	(0,29 -- 1,07)	0,08	0,36	(0,18 -- 0,69)	<0,01
4	(246)	0,53	(0,28 -- 1,00)	0,05	0,27	(0,13 -- 0,53)	<0,0001
5 (menos pobre)	(235)	0,33	(0,16 -- 0,71)	0,00	0,17	(0,07 -- 0,40)	<0,0001
Área de residência							
Urbana	(770)	1,00	(referência)		1,00	(referência)	
Rural	(408)	3,55	(2,29 -- 5,49)	<0,0001	4,93	(3,08 -- 7,88)	<0,0001
Número de visitas pré-natais	(1.175)	1,01	(0,93 -- 1,09)	0,82	0,93	(0,86 -- 1,00)	0,06

Tabela 3 – Razão de *odds*, ajustada, para associação entre características das participantes do estudo e o diagnóstico de malária antenatal ou de infecção por *Plasmodium* no parto

(continua)

Desfecho	Variável	OR (ajustado)	(IC 95%)	P
Malária antenatal	Anos de escolaridade			
	0	0,12	(0,01 -- 0,96)	0,41
	1--5	0,84	(0,40 -- 1,73)	0,63
	6--10	0,80	(0,46 -- 1,36)	0,41
	>10	1,00	(referência)	
	Área de residência (rural vs. urbana)	3,40	(2,13 -- 5,44)	<0,0001
Infecção por <i>Plasmodium</i> no parto	idade (anos)			
	13--20	1,00	(referência)	
	21--30	0,68	(0,39 -- 1,19)	0,17
	>30	0,39	(0,16 -- 0,95)	0,04
	Índice de riqueza			
	1 (mais pobre)	1,00	(referência)	
	2	0,75	(0,41 -- 1,37)	0,35
	3	0,51	(0,25 -- 1,05)	0,07
	4	0,43	(0,19 -- 0,94)	0,03
	5 (menos pobre)	0,37	(0,14 -- 0,98)	0,05
	Área de residência (rural vs. urbana)	3,94	(2,37 -- 6,56)	<0,001
Malária gestacional (antenatal ou infecção por <i>Plasmodium</i> no parto)	idade (anos)			
	13--20	1,00	(referência)	
	21--30	0,80	(0,51 -- 1,26)	0,33
	>30	0,47	(0,24 -- 0,91)	0,03
	Índice de riqueza			
	1 (mais pobre)	1,00	(referência)	

Tabela 3 - Razão de *odds*, ajustada, para associação entre características das participantes do estudo e o diagnóstico de malária antenatal ou de infecção por *Plasmodium* no parto

(continuação)

Desfecho	Variável	OR (ajustado)	(IC 95%)	P
	2	0,93	(0,57 -- 1,51)	0,77
	3	0,49	(0,27 -- 0,88)	0,02
	4	0,51	(0,28 -- 0,95)	0,03
	5 (menos pobre)	0,39	(0,18 -- 0,82)	0,01
	Área de residência (rural vs. urbana)	3,58	(2,42 -- 5,29)	<0,0001

(conclusão)

4.5 IMPACTO CLÍNICO DA MALÁRIA GESTACIONAL

Com o objetivo de avaliar o impacto da malária gestacional nos desfechos de peso ao nascer, comprimento ao nascer e hemoglobina materna no momento do parto, foram construídos diversos modelos de regressão linear múltipla. Todos os modelos foram ajustados para os possíveis fatores de confusão, e são apresentados na Tabela 4. A população analisada foi a das mães dos nascidos vivos, não gêmeos, que possuíam informações para todas as variáveis incluídas nos modelos, e seus filhos.

Entre as 93 gestantes expostas a um ou mais casos de malária antenatal que participaram das análises 3,2% tiveram filhos prematuros, 8,6% filhos com baixo peso ao nascer e 20,4% filhos pequenos para a idade gestacional. Ser primigesta, ter hipertensão crônica e ter fumado durante a gestação foram fatores que se associaram negativamente com o tamanho ao nascer dos recém-nascidos deste estudo (Tabela 4). Observa-se que malária antenatal está associada com redução de peso e comprimento ao nascer (Tabela 4). A redução média no escore z de peso ao nascer foi de 0,36 (IC 95%, - 0,57 - -0,14 $p = <0,01$) e no escore z de comprimento, 0,31 (IC 95%, - 0,54 - -0,08, $p = 0,01$).

Parto cesariano e necessidade de transfusão sanguínea durante a gestação foram fatores associados ao decréscimo da concentração de hemoglobina materna no momento do parto (Tabela 4), ao passo que o número de consultas de pré-natal associou-se positivamente com o nível de hemoglobina no parto. Parturientes que tiveram malária antenatal tiveram redução

média na concentração de hemoglobina de 0,34 g/100 mL (IC 95%, -0,62 - -0,05 p = 0,02); 51,6% dessas parturientes estavam anêmicas no momento do parto.

Tabela 4 – Impacto de malária antenatal e infecção por *Plasmodium* no parto para o tamanho ao nascer e nível de hemoglobina materna no parto, em Cruzeiro do Sul, Acre, depois de ajustar para fatores de confusão por análise de regressão linear múltipla

(continua)

Desfecho	Modelo	Número de gestantes	Variável	B	(IC 95%)	P
Peso ao nascer (escore z)	1	(1.139)	Malária antenatal (sim vs. não)	-0,36	(-0,57 -- -0,14)	<0,01
			Paridade (primigesta vs. multigesta)	-0,28	(-0,42 -- -0,14)	<0,001
			Tipo de parto (cesariano vs. vaginal)	0,28	(0,15 -- 0,40)	<0,001
			Hipertensão crônica (sim vs. não)	-0,25	(-0,43 -- -0,06)	0,01
			Fumo antenatal (sim vs. não)	-0,28	(-0,48 -- -0,07)	0,01
	2	(1.139)	Infecção por <i>Plasmodium</i> no parto (sim vs. não)	-0,07	(-0,29 -- 0,15)	0,53
			Paridade (primigesta vs. multigesta)	-0,28	(-0,42 -- -0,14)	<0,001
			Tipo de parto (cesariano vs. vaginal)	0,28	(0,16 -- 0,40)	<0,001
			Hipertensão crônica (sim vs. não)	-0,25	(-0,43 -- -0,06)	0,01
			Fumo antenatal (sim vs. não)	-0,27	(-0,47 -- -0,06)	0,01
Comprimento ao nascer (escore z)	1	(1.132)	Malária antenatal (sim vs. não)	-0,31	(-0,54 -- -0,08)	0,01
			Paridade (primigesta vs. multigesta)	-0,24	(-0,39 -- -0,09)	<0,01
			Sexo do recém-nascido (masc. vs. fem.)	-0,18	(-0,30 -- -0,05)	<0,01
			Hipertensão crônica (sim vs. não)	-0,23	(-0,43 -- -0,03)	0,02
			Fumo antenatal (sim vs. não)	-0,30	(-0,52 -- -0,08)	0,01
	2	(1.132)	Infecção por <i>Plasmodium</i> no parto (sim vs. não)	-0,15	(-0,39 -- 0,09)	0,23
			Paridade (primigesta vs. multigesta)	-0,23	(-0,38 -- -0,08)	<0,01

Tabela 4 - Impacto de malária antenatal e infecção por *Plasmodium* no parto para o tamanho ao nascer e nível de hemoglobina materna no parto, em Cruzeiro do Sul, Acre, depois de ajustar para fatores de confusão por análise de regressão linear múltipla

(continuação)

Desfecho	Modelo	Número de gestantes	Variável	B	(IC 95%)	P
Hemoglobina materna no parto (g/100ml)	1	(1.098)	Sexo do recém-nascido (masc. vs.fem.)	-0,18	(-0,30 -- -0,05)	0,01
			Hipertensão crônica (sim vs. não)	-0,23	(-0,43 -- -0,03)	0,02
			Fumo antenatal (sim vs. não)	-0,29	(-0,51 -- -0,07)	0,01
			Malária antenatal (sim vs. não)	-0,34	(-0,62 -- -0,05)	0,02
			Número de visitas de pré-natal	0,06	(0,03 -- 0,90)	<0,001
			Sexo do recém-nascido (masc. vs. fem.)	0,18	(0,02 -- 0,33)	0,03
			Tipo de parto (cesariano vs. vaginal)	-0,32	(-0,49 -- -0,15)	<0,001
			Transfusão sanguínea (sim vs. não)	-3,28	(-4,21 -- -2,35)	<0,001
	2	(1.098)	Infecção por <i>Plasmodium</i> no parto (sim vs. não)	-0,12	(-0,42 -- 0,18)	0,44
			Número de visitas de pré-natal	0,06	(0,03 -- 0,09)	<0,001
			Sexo do recém-nascido (masc. vs. fem.)	0,18	(0,02 -- 0,34)	0,02
			Tipo de parto (cesariano vs. vaginal)	-0,33	(-0,49 -- -0,16)	<0,001
			Transfusão sanguínea (sim vs. não)	-3,19	(-4,13 -- -2,25)	<0,001

(conclusão)

O impacto da malária gestacional para os desfechos deste estudo - peso ao nascer (Figura 5), comprimento ao nascer (Figura 6) e concentração de hemoglobina materna no momento do parto (Figura 7) - foi também avaliado de acordo com o trimestre da gestação, número de episódios diagnosticados e espécie do parasito. Observa-se que: um único caso de malária vivax antenatal foi suficiente para afetar negativamente o crescimento fetal e a concentração de hemoglobina materna; episódios repetidos de malária vivax antenatal têm efeito negativo maior

para peso ao nascer e para o nível de hemoglobina materna no parto do que um único episódio; malária antenatal no terceiro trimestre de gestação teve impacto negativo maior sobre os desfechos analisados do que malária no primeiro ou segundo trimestre de gestação.

Figura 5 – Impacto da malária gestacional para peso ao nascer

Impacto da malária gestacional para peso ao nascer, em Cruzeiro do Sul, Acre. Para malária antenatal foram analisados o trimestre da gestação em que o episódio foi notificado, a espécie do parasito e o número de episódios. Infecção no momento do parto foi analisada de acordo com a espécie do parasito. Foram feitas análises de regressão linear múltipla. Cada valor de B (coeficiente não padronizado) é referente a um modelo corrido e indica a média de desvio em escore z atribuída à malária comparada com gestações livres de malária, depois de se ajustar para os fatores de confusão listados na Tabela 4.

Não foi observado impacto clínico negativo de infecção por *P. vivax* no momento do parto para os desfechos analisados neste estudo. Foi encontrada, entretanto, associação entre infecção por *P. falciparum* no momento do parto e diminuição do escore z de comprimento ao nascer de 0,69 (IC 95% -1,29 - -0,09, $p = 0,02$) (Figura 6).

Figura 6 – Impacto da malária gestacional para comprimento ao nascer

Impacto da malária gestacional para comprimento ao nascer, em Cruzeiro do Sul, Acre. Para malária antenatal foram analisados o trimestre da gestação em que o episódio foi notificado, a espécie do parasito e o número de episódios. Infecção no momento do parto foi analisada de acordo com a espécie do parasito. Foram feitas análises de regressão linear múltipla. Cada valor de B (coeficiente não padronizado) é referente a um modelo corrido e indica a média de desvio em escore z atribuída à malária comparada com gestações livres de malária, depois de se ajustar para os fatores de confusão listados na Tabela 4.

Figura 7 – Impacto da malária gestacional para o nível da hemoglobina materna no parto

Impacto da malária gestacional para o nível da hemoglobina materna no momento do parto, em Cruzeiro do Sul, Acre. Para malária antenatal foram analisados o trimestre da gestação em que o episódio foi notificado, a espécie do parasito e o número de episódios. Infecção no momento do parto foi analisada de acordo com a espécie do parasito. Foram feitas análises de regressão linear múltipla. Cada valor de B (coeficiente não padronizado) é referente a um modelo corrido e indica a média de desvio na concentração de hemoglobina atribuída à malária comparada com gestações livres de malária, depois de se ajustar para os fatores de confusão listados na Tabela 4.

4.6 MALÁRIA CONGÊNITA

Entre as 637 amostras de cordão umbilical que tiveram diagnóstico molecular feito, 4 (0,6%) foram positivas para *P. vivax* e 2 (0,3%) para *P. falciparum*, totalizando uma prevalência de 0,9% de malária congênita na população de estudo. As mães dos 6 recém-nascidos diagnosticados com malária congênita também foram diagnosticadas com infecção por *Plasmodium*, da mesma espécie que seus filhos, no momento do parto. Nos primeiros 30 dias de vida somente uma das infecções congênitas foi localizada no banco de dados do SIVEP.

Essa infecção foi diagnosticada por exame de gota espessa, como malária vivax, no 20º dia de vida do recém-nascido; é possível que essa tenha sido a única infecção congênita sintomática da população de estudo.

4.7 FALHAS NA NOTIFICAÇÃO E NO TRATAMENTO

Parcela significativa dos casos de malária antenatal, 37 (30,3%), não foi notificada corretamente como caso de malária em paciente gestante. A maioria dos casos notificados de maneira errada, 64,9%, ocorreram no primeiro trimestre de gestação, quando algumas mulheres talvez não tivessem conhecimento da gestação.

O medicamento primaquina, que não deve ser administrado a gestantes, foi notificado como esquema de tratamento de 59 casos de malária vivax antenatal. Entre esses casos, 39,0% (n = 23) ocorreram no primeiro trimestre, 25,4% (n = 15) no segundo trimestre, e 35,6% (n = 21) no terceiro trimestre. Quase a metade desses casos, 49,1% (n = 29), apesar de terem sido notificados com o esquema de tratamento não recomendado para gestantes, foram notificados corretamente como casos de malária em paciente gestante.

Cinquenta e duas gestantes receberam primaquina ao longo da gestação, sendo que 5 delas receberam duas vezes o tratamento e uma recebeu três vezes. Todas as gestantes que receberam primaquina tiveram filhos nascidos vivos. A comparação entre gestantes que tiveram um único caso de malária vivax, e que tiveram notificação de tratamento com e sem primaquina, não mostrou diferença estatística para nível de hemoglobina materna no parto, escore z de peso e de comprimento, e hemorragia na gestação ou no parto.

Nenhuma das 13 gestantes do estudo que tiveram mais de uma malária vivax notificada teve notificação de tratamento preventivo de recaídas com cloroquina por 12 semanas.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho foi desenhado e realizado sob a perspectiva de que a malária na gestação é um risco para a saúde materna, fetal e neonatal (MACGREGOR; AVERY 1974; DESAI et al., 2007). Foi considerado para a construção desta pesquisa que muito da epidemiologia e da morbidade da malária vivax associada à gestação permanece desconhecido (DESAI et al., 2007; MUELLER et al., 2009; BARDAJÍ et al., 2017), sendo fundamentais as investigações dessa doença em diferentes contextos epidemiológicos (COSTA et al., 2012). Finalmente, este trabalho foi realizado sob o olhar de que a saúde durante a vida intrauterina é um dos determinantes para a saúde infantil e que os fatores que afetam a saúde não acontecem ao acaso mas, em grande parte, de acordo com a formação socioeconômica local (VICTORA et al., 2006).

Trata-se de estudo observacional componente do projeto MINA-Brasil - conjunto de pesquisas epidemiológicas sobre condições de saúde e nutrição materno-infantil na cidade de Cruzeiro do Sul, no Estado do Acre -, que identificou fatores econômicos e demográficos associados ao desenvolvimento de malária clínica ao longo da gestação e de infecção por *Plasmodium* no momento do parto, bem como as implicações dessas infecções para o crescimento fetal e para o nível de hemoglobina materna no parto.

5.1 OCORRÊNCIA

A incidência de malária nas Américas diminuiu significativamente entre 2005 e 2014, porém desde 2015 tem sido reportado crescimento de casos nessa região. No ano de 2016, nove países americanos tiveram aumento da incidência de malária. Em 2017, com expansão de 48% no número de casos notificados em relação ao ano de 2016, o Brasil foi incluído entre os países com aumento da incidência da doença (PAHO, 2018). Nesse estudo, realizado nos anos de 2015 e 2016, observou-se que a malária gestacional pode ser comum na Amazônia Brasileira. A prevalência de malária antenatal clínica entre as participantes do estudo foi de 8,0% (n = 94), e de infecção por *Plasmodium* no momento do parto, de 7,5% (n = 89); ao todo 12,5% (n = 148) das gestantes que participaram do estudo em questão foram expostas à infecção clínica antenatal ou infecção por *Plasmodium* no momento do parto.

O principal fator associado com o desenvolvimento da malária gestacional foi o local de moradia, urbano ou rural, sendo as gestantes da zona rural as mais vulneráveis à infecção - razão de *odds* ajustada de 3,40 (IC 95% 2,13 - 5,44, $p = < 0,0001$) para malária ao longo da gestação; razão de *odds* ajustada de 3,94 (IC 95% 2,37 - 6,56, $p = < 0,001$) para infecção por *Plasmodium* no momento do parto (Tabela 3). O índice de riqueza também foi associado com a malária na gestação, sendo as gestantes do quintil mais rico as menos propensas a desenvolver malária gestacional - razão de *odds* ajustada de 0,39 (IC 95% 0,18 - 0,82, $p = 0,01$) (Tabela 3).

Considerando o efeito negativo de infecções por *Plasmodium* na gestação para os desfechos gestacionais (ROGERSON et al., 2007; KOURTIS et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2015), os resultados deste estudo sugerem que as mulheres da zona rural de Cruzeiro do Sul tenham gestações de alto risco. Além de conviverem com maior risco de infecção por *Plasmodium*, as gestantes da zona rural estão expostas a diversos outros fatores que podem afetar negativamente a saúde. Na zona rural o saneamento é escasso, há alta prevalência de violência relacionada aos conflitos pela posse de terras, e de violências domésticas e sexuais, há dificuldade de acesso aos serviços de saúde, e estão presentes os maiores índices de mortalidade infantil e de analfabetismo do Brasil (BRASIL, 2013).

A vulnerabilidade das populações do campo e da floresta, no que se refere à saúde, é reconhecida pelo Ministério da Saúde através da Política Nacional de Saúde Integral das Populações do Campo e da Floresta (PNSIPCF), implementada no país em 2011 (BRASIL, 2013). De acordo com Victora et al. (2006), os serviços de saúde devem dar mais atenção às gestantes que possuem maior probabilidade de gerar crianças de baixo peso ou com alto risco de morrer no período perinatal ou infantil, devendo buscar ativamente essas gestantes na comunidade. Assim, é fundamental que as políticas de saúde e educação destinadas às populações do campo e da floresta sejam implementadas e, quando implementadas, que sejam resilientes, de forma a serem mantidas independentemente da situação política e econômica do país.

O segundo fator associado com malária gestacional neste estudo foi a pobreza que, assim como a moradia em região rural, pode estar associada a diversos outros fatores de risco para a saúde materno-fetal (VICTORA et al., 2006) (Tabela 3). A associação entre pobreza e malária repete-se nas diferentes regiões endêmicas do mundo (TUSTING et al., 2013), tendo sido sugerido que ao mesmo tempo que a pobreza aumenta o risco de infecção a malária contribui para a manutenção da pobreza (SACHS; MALANEY, 2002). Sob essa perspectiva, Tusting et al. (2013) sugeriram que associados às políticas de controle e eliminação da malária

deveriam ser implementados programas que fomentassem o desenvolvimento socioeconômico das regiões endêmicas. Tusting et al. (2013) sugeriram, ainda, que o desenvolvimento socioeconômico pode ser uma intervenção efetiva e sustentável para o controle e eliminação da malária.

Ser primigesta não foi associado ao desenvolvimento de malária clínica neste estudo. É possível que os níveis de transmissão de malária em Cruzeiro do Sul não sejam suficientemente altos a ponto da maioria das multigestas terem sido expostas à malária nas gestações anteriores e terem tido a possibilidade de desenvolver imunidade clínica. Foi encontrada, entretanto, associação limítrofe entre ser primigesta e infecção por *P. falciparum* no momento do parto, razão de *odds* ajustada de 4,80 (IC 95% 0,99 - 23,17, $p = 0,05$). Uma possível explicação para não ter sido observada associação entre a condição de primigesta e infecção por *P. vivax* é que a aquisição de proteção à malária falciparum na gestação - ao longo das exposições ao parasito em gestações prévias -, em decorrência do desenvolvimento de anticorpos que inibem a adesão dos parasitos nos tecidos placentários, aconteça mais rapidamente do que para malária vivax.

As gestantes com mais de 30 anos foram menos propensas ao desenvolvimento de malária gestacional quando comparadas com as gestantes mais jovens, de 13 a 20 anos, *odds* ajustada de 0,47 (IC 95% 0,24 - 0,91, $p = 0,03$) (Tabela 3). Assim, em consonância com estudos anteriores realizados por Desai et al. (2007), Bôttto-menezes et al. (2015) e Requena et al. (2017), os resultados deste estudo sugerem que a imunidade adquirida com a idade, ao longo de diversas exposições à infecção por *Plasmodium*, pode ter papel protetor também durante a gestação.

5.1.1 Gestantes, um possível reservatório de malária na Amazônia Brasileira

Neste estudo foi observado que casos assintomáticos de malária na gestação podem ser comuns na região amazônica, onde a principal espécie circulante é *P. vivax*, e onde os níveis da transmissão da doença, quando comparados com os níveis de transmissão de malária no continente africano e no Sudeste Asiático, são baixos. A maioria dos casos de infecção por *Plasmodium* diagnosticados por metodologia molecular no momento do parto, 89,9% ($n = 80$), foram casos assintomáticos, não diagnosticados pelo serviço de saúde e, consequentemente, não tratados.

A presença de casos assintomáticos em gestantes é conhecida (GALATAS et al., 2016; YANOW et al., 2016), tendo sido sugerido que o risco de desenvolvimento de infecção por *P.*

falciparum assintomática é maior em gestantes do que em mulheres não gestantes (KHAN et al., 2014). As infecções assintomáticas são um desafio para o controle da malária porque comumente não são diagnosticadas por buscas passiva ou ativa, que são restringidas aos casos febris. No caso das gestantes a possibilidade de diagnóstico de infecções assintomáticas está limitada à busca ativa que deveria ser feita durante as consultas de pré-natal, independentemente da presença de sintomas. Porém, como levantado por Luz et al. (2013), a busca ativa de malária nas consultas de pré-natal na Amazônia Brasileira, apesar de ser preconizada pelo Ministério da Saúde, é escassa. Soma-se à pouca adesão da recomendação feita pelo Ministério da Saúde, a dificuldade de se diagnosticar infecções assintomáticas, que frequentemente apresentam parasitemias baixas dificilmente detectáveis pela metodologia de microscopia de gota espessa (BARBOSA et al., 2014). Assim, existe a possibilidade das gestantes com infecções assintomáticas serem reservatórios de malária na Amazônia Brasileira mas, possivelmente, reservatórios sem relevância epidemiológica para manutenção da doença no país.

5.2 IMPACTO DA MALÁRIA AO LONGO DA GESTAÇÃO PARA ASPECTOS DA SAÚDE MATERNO-FETAL

5.2.1 Reflexões sobre a metodologia utilizada para análise

Cabe aqui breve reflexão sobre a metodologia utilizada para a análise do impacto da malária ao longo da gestação no que se refere ao peso ao nascer, ao comprimento ao nascer, e ao nível de hemoglobina materna no momento do parto. Para construção dos modelos de regressão optou-se por utilizar as variáveis referentes aos desfechos de interesse na forma contínua e não dicotômica. Essa abordagem permitiu a detecção de piora nos desfechos analisados independentemente da classificação como indivíduo anêmico ou com baixo peso ao nascer.

A análise do impacto da malária para o crescimento fetal foi feita com base no escore z definido a partir dos parâmetros do *INTERGROWTH-21st*. O *INTERGROWTH-21st* foi um estudo multicêntrico realizado em oito países - Brasil, China, Índia, Itália, Quênia, Oman, Reino Unido e Estados Unidos - que investigou o crescimento, a saúde e a nutrição desde o início da gestação até a infância, com o objetivo central de determinar padrões de crescimento em população saudável (VILLAR et al., 2013). Além disso, o projeto teve como objetivos: avaliar padrões de crescimento a partir do início da gestação; avaliar padrões de peso, comprimento e perímetro cefálico de acordo com a idade gestacional; investigar os determinantes para

prematuridade e os padrões de crescimento de crianças prematuras; desenvolver metodologia para determinar a IG a partir de USG feita do meio para o final da gestação (VILLAR et al., 2013). Estruturado da mesma forma que o *Multicentre Growth Reference Study* (MGRS) - projeto desenvolvido pela OMS que investigou o crescimento infantil de 0 a 5 anos - o *INTERGROWTH-21st*, por ter incluído o desenvolvimento fetal na investigação, com avaliações do crescimento intrauterino, enriqueceu os dados já existentes e consolidou o princípio biológico de que as variações de crescimento humano entre as diferentes populações são principalmente decorrentes de fatores ambientais, nutricionais e socioeconômicos (PAPAGEORGHIU et al., 2018).

Optou-se por restringir a avaliação do impacto da malária para os desfechos gestacionais aos nascidos vivos a fim de evitar o viés de participação. Houve menor participação entre as mulheres que tiveram aborto ou filhos natimortos, de forma que a população deste estudo não representa as gestantes que tiveram acesso à maternidade de Cruzeiro do Sul entre julho de 2015 e junho de 2016, mas sim representa as que tiveram filhos nascidos vivos nessa maternidade durante o período de estudo.

5.2.2 Impacto da malária para desfechos gestacionais

Neste estudo foi observado que um único caso de malária vivax clínica antenatal, quando comparado com gestações livres de malária antenatal, é capaz de impactar negativamente os desfechos gestacionais analisados (Figuras 5, 6, e 7): peso ao nascer, redução de 0,30 no escore z (IC 95% -0,57 - -0,02 p = 0,04); comprimento ao nascer, redução de 0,41 no escore z (IC 95% -0,71 - -0,11 p = 0,01); nível de hemoglobina materna no parto, redução de 0,39 g/100 mL (IC 95% -0,76 - -0,02 p = 0,03). Foi observado, ainda, que casos repetidos de malária vivax, que podem ser causados por recaídas, têm efeito negativo mais pronunciado para o peso ao nascer, redução de 0,65 no escore z (IC 95% -1,19 - -0,11 p = 0,02), e para a hemoglobina materna no momento do parto, redução de 0,92 g/100 mL (IC 95% -1,64 - -0,21 p = 0,01). O agravamento da piora dos desfechos gestacionais de acordo com o número de episódios de malária vai ao encontro ao estudo de Lopez-perez et al. (2016), que associou segundo episódio de malária vivax na gestação com desenvolvimento de formas graves da doença, em estudo realizado na Colômbia, e ao de Moore et al. (2017a), que observou crescimento linear do *odds* de nascimento de criança PIG a cada novo episódio de malária, em estudo na fronteira entre a Tailândia e o Mianmar.

Entender as consequências da malária de acordo com a idade gestacional no momento da infecção pode ser importante para se desenhar as políticas públicas de prevenção e controle da malária gestacional (MOORE et al., 2017a), e para o entendimento da biologia dessa doença. Sob essa perspectiva, foi analisado o impacto da malária de acordo com o trimestre de gestação. Não foi observada associação entre malária no início da gestação e piora nos desfechos gestacionais. Porém, o impacto negativo da malária no início da gestação para os desfechos gestacionais é conhecido, tendo sido a infecção por *Plasmodium* no início da gestação associada com aborto (MCGREADY et al., 2012; MOORE et al., 2016), e a malária falciparum no início da gestação negativamente associada com crescimento fetal (HUYNH et al., 2011). No presente estudo, é possível que a malária no início da gestação não tenha se associado com piora nos desfechos gestacionais porque as análises se restringiram aos nascidos vivos. Assim os fetos, que sobreviveram à malária gestacional no início de seu desenvolvimento, podem ter conseguido se recuperar dos efeitos dessa exposição ao longo dos meses subsequentes de gestação, como sugerido por MCGREADY et al. (2012). Foi observada associação entre malária no terceiro trimestre de gestação com redução de 0,52 no escore z de peso ao nascer (IC 95% -0,89 - -0,15 $p = < 0,01$) (Figuras 5), com redução de 0,42 no escore z comprimento ao nascer (IC 95% -0,82 - -0,01 $p = 0,04$) (Figuras 6), e com diminuição do nível de hemoglobina materna no parto, redução de 0,58 g/100 mL (IC 95% -1,07 - -0,10 $p = 0,02$) (Figuras 7).

As infecções no momento do parto por *P. vivax* ou *P. falciparum* diagnosticadas por metodologia molecular foram predominantemente assintomáticas, 89,9% ($n = 80$), e, com exceção da associação entre infecção por *P. falciparum* no parto e redução no escore z de comprimento ao nascer de 0,69 (IC 95% -1,29 - -0,09 $p = 0,02$) (Figura 6), não se associaram com os desfechos avaliados neste estudo. Não é possível afirmar que as infecções assintomáticas por *Plasmodium* em Cruzeiro do Sul sejam benignas porque não foram avaliadas infecções assintomáticas ao longo da gestação e porque as análises deste estudo limitaram-se aos nascidos vivos. O efeito negativo das infecções assintomáticas para a saúde materno-fetal já foi observado tanto para infecções provocadas por *P. falciparum* como para as infecções provocadas por *P. vivax*, tendo sido as infecções por essas espécies de plasmódio assintomáticas no primeiro trimestre de gestação associadas com aborto (MCGREADY et al., 2012) e infecções por *P. falciparum* assintomáticas associadas com aumento de risco de anemia ao longo da gestação (MATANGILA et al., 2014).

5.3 MALÁRIA CONGÊNITA

A prevalência de malária congênita foi de 0,9% (n = 6), sendo quatro casos de infecção por *P. vivax* e dois por *P. falciparum*. Esse valor é comparável com a prevalência de malária congênita encontrada em Manaus em estudo realizado entre os anos de 2008 e 2011, 1,0% (BARDAJÍ et al., 2017). Os casos de malária congênita foram predominantemente assintomáticos, sendo que o único caso clínico foi provocado por infecção por *P. vivax*. Em estudo realizado em Gana, onde a prevalência de malária congênita com diagnóstico molecular foi de 13,6% (n = 9), nenhum dos casos apresentou parasitemia detectável por microscopia nos 15 dias pós-parto (WAGNER et al., 1998). De fato, a malária falciparum clínica em crianças de até seis meses é relativamente incomum, sendo as parasitemias, em geral, baixas (WAGNER et al., 1998; RILEY et al., 2001). A presença de proteção à malária vivax clínica nos primeiros meses de vida permanece não resolvida. No Sudeste Asiático, em região de cocirculação de *P. vivax* e *P. falciparum*, *P. vivax* é a espécie mais prevalente em crianças de até dois anos (KARYANA et al., 2008; POESPOPRODJO et al., 2009). É possível que a proteção ao *P. vivax* no início da vida seja menos pronunciada do que a proteção ao *P. falciparum*.

Ainda que aparentemente os casos de malária congênita sejam em sua maioria assintomáticos, casos graves desse tipo de infecção já foram relatados (PIÑEROS-JIMÉNEZ et al., 2008; PIÑEROS-JIMÉNEZ et al., 2011; BHATIA et al., 2016; GÜLAŞĐ; ÖZDENER, 2016; OLUPOT-OLUPOT et al., 2018). Porque os sintomas de malária em crianças pequenas são inespecíficos e, portanto, possíveis de serem confundidos com infecções bacterianas e virais, é importante que o diagnóstico de malária faça parte da rotina de investigação de doenças e tratamento de crianças de regiões endêmicas para malária, como destacado por Bhatia et al. (2016).

5.4 TRATAMENTO E NOTIFICAÇÃO

No Brasil, as políticas públicas de saúde vigentes garantem que os medicamentos antimaláricos não sejam disponibilizados para venda, e definem a malária como doença de notificação obrigatória. Essas medidas favorecem as estimativas de incidência da doença, a disponibilização de medicamentos íntegros, e o controle do desenvolvimento de resistência dos parasitos aos antimaláricos. As medidas são corretas e coerentes com a epidemiologia da

malária no país. Porém, por meio da análise do banco de dados do SIVEP, foram diagnosticadas falhas de notificação e possíveis falhas de esquema de tratamento prescrito.

Foi observado que 30,3% (n = 37) dos casos de malária antenatal das participantes deste estudo não foram notificados como casos em pacientes gestantes. É possível que parte dessas mulheres não soubessem que estavam grávidas. Contudo, 35,1% (n = 13) das notificações erradas foram feitas em casos notificados no segundo e terceiro trimestre de gestação quando, certamente, parte das gestantes sabia que estava grávida. Ao não ser reconhecida a gravidez durante o diagnóstico de malária, o esquema de tratamento prescrito não será correto, e a saúde da mãe e do feto em desenvolvimento estará em risco.

O Guia Prático de Tratamento de Malária no Brasil (BRASIL, 2010) preconiza que a primaquina não seja prescrita a gestantes. Ainda assim, foi observado que 48,4% (n = 59) dos casos de malária vivax notificados entre as participantes deste estudo foram notificados com o esquema de tratamento com primaquina; destes, 49,1% (n = 29) foram notificados como casos em pacientes gestantes. Portanto, o tratamento para malária disponibilizado para as gestantes, de acordo com as notificações do SIVEP, no segundo município mais populoso do Estado do Acre, responsável por 15,1% dos casos de malária notificados no país no ano de 2016, não segue as recomendações do Ministério da Saúde.

A notificação de recebimento de primaquina na gestação não foi associada com piora nos desfechos de nível de hemoglobina materna no momento do parto, peso e comprimento ao nascer. É possível que nenhuma das gestantes analisadas, nem seus filhos, tenham fenótipo de deficiência G6PD e que, por isso, não tenham sido observados efeitos negativos do uso de primaquina na gestação. Na região do Vale do Alto Juruá, a prevalência de deficiência G6PD em homens é de 4,5% (DOMBROWSKI et al., 2017). A prevalência do fenótipo deficiente em mulheres da mesma região será menor porque essa deficiência é ligada ao cromossomo x. Deve ser considerado que a perda de seguimento neste estudo foi maior entre as gestantes que tiveram abortos e filhos natimortos e, assim, os efeitos mais dramáticos do uso de primaquina não puderam ser avaliados.

O tratamento profilático de 12 semanas com cloroquina, que deve ser prescrito quando há segundo caso de malária vivax diagnosticado ao longo da gestação, não foi disponibilizado a nenhuma das participantes deste estudo que tiveram mais de um caso de malária vivax antenatal. É observado, novamente, o não cumprimento das recomendações do Ministério da Saúde para tratamento de malária em gestantes. Neste estudo, em consonância com Lopez-perez et al. (2016) e Moore et al. (2017a), foi observado que o acúmulo de casos de malária

vivax ao longo da gestação agrava os efeitos dessa doença para o desfecho de peso ao nascer (Figura 5). Frente a esses dados, seria plausível considerar a possibilidade de reformulação da recomendação de tratamento feita pelo Ministério da Saúde, de forma que o tratamento profilático com cloroquina seja prescrito já na primeira malária vivax diagnosticada na gestação, e não na primeira recaída.

Sabendo que as infecções assintomáticas têm efeitos negativos para a saúde materno fetal, é essencial que a busca ativa de infecção por *Plasmodium* seja feita conforme recomendado pelo Ministério da Saúde. Como visto por Luz et al. (2013), essa política não é satisfatoriamente realizada. As dificuldades de se aplicar as recomendações do Estado para o cuidado da saúde materno-infantil em área endêmica para a malária repetem-se em países vizinhos ao Brasil. As políticas de saúde da Colômbia, assim como as do Brasil, preconizam que seja feita busca ativa de casos de malária durante o pré-natal independentemente da presença de sintomas. Porém, assim como no Brasil, essa política de busca ativa raramente é aplicada (CAMPOS et al., 2011).

Existe a possibilidade de que as gestantes deste estudo tenham recebido o esquema de tratamento correto - que não tenham recebido primaquina, e que tenham recebido o tratamento profilático com cloroquina a partir do segundo caso de malária vivax diagnosticado na gestação - e que a falha, detectada neste trabalho através da análise do banco de dados do SIVEP, tenha ocorrido na notificação. Pode-se afirmar com segurança, ao observarmos que parcela significativa das notificações de gestantes diagnosticadas com malária não especificam a condição de gestante, mas ao contrário, afirmam serem pacientes não gestantes, que há falha de notificação mesmo em regiões com altos níveis de transmissão de malária, onde seria possível supor que o sistema de notificação fosse preciso. Sob esse panorama, pode-se afirmar certamente que as estimativas de malária na gestação baseadas nas notificações SIVEP são subestimadas. Não é conhecida, portanto, a incidência de malária na gestação no Brasil.

É fundamental para a saúde materna, fetal e infantil, como levantado por Marchesini et al. (2014) e por Bardají et al. (2017), que nas áreas endêmicas para malária haja integração entre o sistema de controle de endemias e os programas de acompanhamento pré-natal. Essa integração contribuiria para a busca ativa de casos de malária ao longo da gestação, para a prescrição de medicamentos corretos e adesão ao uso desses medicamentos, para a estimativa da incidência de malária gestacional no Brasil, e, também, para o reconhecimento da malária associada à gestação como um problema de saúde pública no Brasil.

5.5 AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As gestantes que tiveram parto domiciliar, e que possivelmente são as mais afetadas pela malária gestacional - seja porque há mais casos de malária na região rural quando comparada com a urbana, seja em razão dos aspectos socioeconômicos que podem acentuar o efeito negativo da malária ao longo da gestação, ou ainda, devido ao menor acesso à atenção pré-natal - não fizeram parte deste estudo, cujo recorte foi de base hospitalar. Também não participaram das análises de efeito da malária para os desfechos gestacionais as gestantes que sofreram aborto ou que tiveram filhos natimortos. Assim, as análises, que se restringiram aos nascidos vivos, estão sujeitas ao efeito de sobrevivente. Porque a busca ativa de malária durante as consultas de pré-natal é escassa, os casos da doença notificados pelo SIVEP restringiram-se aos casos sintomáticos. Por isso, não foi avaliado o efeito da malária gestacional assintomática para o crescimento fetal e para o nível de hemoglobina materna no momento do parto. Outro ponto importante é que o número de casos positivos para malária antenatal causada por *P. falciparum*, ou infecção no momento do parto por esse parasito, foi pequeno, o que pode ter mascarado o efeito negativo desse tipo de infecção para os desfechos analisados. Ao serem revistas todas as limitações deste estudo, pode-se concluir que os efeitos da malária gestacional para o crescimento fetal e para a saúde materna foram, possivelmente, subestimados.

5.6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo confirmam que a malária vivax na gestação pode ter implicações graves para a saúde materno-fetal, sendo que um único caso clínico é suficiente para afetar negativamente os desfechos gestacionais, e episódios repetidos provocam efeitos negativos ainda maiores. No âmbito local, os resultados deste estudo evidenciam a malária na gestação como problema de saúde pública nas regiões endêmicas do Brasil.

As conclusões pontuais são:

1. As gestantes da zona rural e as gestantes mais pobres têm maior chance de desenvolver malária gestacional em Cruzeiro do Sul, constituindo um grupo de risco que deve receber maior atenção dos serviços de saúde;

2. A prevalência relativamente alta de malária gestacional entre as participantes deste estudo indicam a malária associada à gestação como um problema de saúde pública no Brasil;
3. Há indicação de que existem falhas graves no tratamento de malária na gestação no Brasil. Certamente há falhas no sistema de notificação do SIVEP, as quais impossibilitam a estimação de incidência de malária na gestação no Brasil com base nessa fonte de dados;
4. Ao mostrar clara associação entre malária gestacional causada por *P. vivax* e piora nos desfechos de crescimento fetal e no nível de hemoglobina materna no momento do parto, efeitos que são ainda mais pronunciados na presença de casos repetidos de malária vivax, os achados deste estudo confirmam a malária gestacional vivax como estado grave de saúde, que não pode ser negligenciado, mesmo em regiões de baixa endemicidade;
5. Finalmente, para promoção da saúde materno-fetal na Amazônia Brasileira os resultados deste estudo indicam ser necessário: (a) que sejam implementadas políticas para o desenvolvimento socioeconômico das regiões endêmicas; (b) que a população exposta entenda a associação negativa entre a malária e os desfechos gestacionais; (c) que o acompanhamento pré-natal das gestantes pobres e da zona rural seja garantido; (d) que seja feita a busca ativa de malária, já preconizada pelo Ministério da Saúde, durante as consultas de pré-natal; (e) que as gestantes recebam o tratamento correto, inclusive o tratamento profilático de recaídas com cloroquina por 12 semanas, e que sejam acompanhadas durante esse período de forma a promover a adesão ao tratamento;

REFERÊNCIAS

- AGUDELO-GARCÍA, O. M. et al. Submicroscopic and asymptomatic congenital infection by *Plasmodium vivax* or *P. falciparum* in Colombia: 37 cases with placental histopathology and cytokine profile in maternal and placental blood. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2017, p.1-15, 2017.
- ALVES, F. P. et al. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. **Americal Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 66, n. 6, p.641-648, 2002.
- ALVES, F. P. et al. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 5, p.777-779, 2005.
- AMARATUNGA, C. et al. A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to *Plasmodium falciparum* Malaria. **Plos One**, v. 6, n. 4, p.1-9, 2011.
- ANSTEY, N. M. et al. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 5, p.220-227, 2009.
- ARMISTEAD, J. S.; ADAMS, J. H. Advancing research models and technologies to overcome biological barriers to *Plasmodium vivax* control. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 2, p.114-126, 2018.
- ATAÍDE, R. et al. Malaria, primigravidae, and antibodies: knowledge gained and future perspectives. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 2, p.85-94, 2014.
- ATAÍDE, R. et al. Malaria in pregnancy interacts with and alters the angiogenic profiles of the placenta. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p.1-15, 2015.

BARBOSA, S. et al. Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* malaria: a case study in rural Amazonia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p.1-13, 2014.

BHATIA, R. et al. Congenital Malaria due to *Plasmodium vivax* infection in a neonate. **Case Reports in Pediatrics**, v. 2016, p.1-2, 2016.

BÔTTO-MENEZES, C. et al. *Plasmodium vivax* malaria in pregnant women in the Brazilian Amazon and the risk factors associated with prematurity and low birth weight: a descriptive study. **Plos One**, v. 10, n. 12, p.1-14, 2015.

BÔTTO-MENEZES, C. et al. Costs associated with malaria in pregnancy in the Brazilian Amazon, a low endemic area where *Plasmodium vivax* predominates. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p.1-19, 2016.

BRABIN, B. The Sick Placenta—The role of malaria. **Placenta**, v. 25, n. 5, p.359-378, 2004.

BRAIR, M. et al. Reduced transfer of tetanus antibodies with placental malaria. **The Lancet**, v. 343, n. 8891, p.208-209, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia prático de tratamento da malária**. Brasília, 2010. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf> Acesso em: 02 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de saúde integral das populações do campo e da floresta**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_saude_populacoes_campo.pdf> Acesso em: 21 abr. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Caderneta da gestante**. Brasília, 2014a. Disponível em: <[http://www.mds.gov.br/webarquivos/arquivo/crianca_feliz/Treinamento_Multiplicadores_Coordenadores/Caderneta-Gest-Internet\(1\).pdf](http://www.mds.gov.br/webarquivos/arquivo/crianca_feliz/Treinamento_Multiplicadores_Coordenadores/Caderneta-Gest-Internet(1).pdf)> Acesso em: 02 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota informativa conjunta** N002/2014. Brasília, 2014b. Disponível em: http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/notas_tecnicas/nota_informativa_conjunta.pdf Acesso em: 19 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano nacional de saúde 2016-2019**. Brasília, 2016a. Disponível em: http://conselho.saude.gov.br/ultimas_noticias/2016/docs/planonacionaisaude_2016_2019.pdf Acesso em: 19 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária em 2015**. 2016b. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/31/Munic--pios-risco-ou-endemicos-IPA2015-2016-05-30.pdf> Acesso em: 19 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária em 2016**. 2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/19/Lista-de-municipios-pertencentes-as-areas-de-risco-ou-endemicas-para-malaria.pdf> Acesso em: 19 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica - Boletins e mapas interativos**. 2018. Disponível em: https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1518_2018_05_15/casos_notificados_2018_regio_Amaznica Acesso em: 30 mar. 2018.

BREYMAN, C. Iron Deficiency Anemia in Pregnancy. **Seminars in Hematology**, v. 52, n. 4, p.339-347, 2015.

BRUTUS, L. et al. *Plasmodium vivax* malaria during pregnancy, Bolivia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 10, p.1605-1611, 2013.

CAMPOS, I. M. et al. Diagnosis of gestational, congenital, and placental malaria in Colombia: comparison of the efficacy of microscopy, nested polymerase chain reaction, and

histopathology. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 84, n. 6, p.929-935, 2011.

CARSON, P. et al. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. **Science**, v. 124, n. 3220, p.484-485, 1956.

CARVALHO, B. O. et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p.638-647, 2010.

CARVALHO, B. O et al. Gestational malaria associated to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* placental mixed-infection followed by foetal loss: a case report from an unstable transmission area in Brazil. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p.1-5, 2011.

CHAIKITGOSIYAKUL, S. et al. A morphometric and histological study of placental malaria shows significant changes to villous architecture in both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infection. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p.1-13, 2014.

CHARNAUD, S. C. et al. Maternal-foetal transfer of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* antibodies in a low transmission setting. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-10, 2016.

CHOTIVANICH, K. et al. *Plasmodium vivax* adherence to placental glycosaminoglycans. **Plos One**, v. 7, n. 4, p.1-7, 2012.

COSTA, F. T. M. et al. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 12, p.1099-1105, 2012.

COWMAN, A. F. et al. The Molecular basis of erythrocyte invasion by malaria parasites. **Cell Host & Microbe**, v. 22, n. 2, p.232-245, 2017.

CUMBERLAND, P. et al. Maternal HIV infection and placental malaria reduce transplacental antibody transfer and tetanus antibody levels in newborns in Kenya. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 4, p.550-557, 2007.

DARU, J. et al. Risk of maternal mortality in women with severe anaemia during pregnancy and post partum: a multilevel analysis. **The Lancet Global Health**, v. 6, n. 5, p.548-554, 2018.

DELLICOUR, S. et al. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. **Plos Medicine**, v. 7, n. 1, p.1-9, 26 2010.

DESAI, M. et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p.93-104, 2007.

DOBBS, K. R.; DENT, A. E. *Plasmodium* malaria and antimalarial antibodies in the first year of life. **Parasitology**, v. 143, n. 02, p.129-138, 2016.

DOMBROWSKI, J. G. et al. G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p.1-9, 2017.

FALADE, C. et al. Epidemiology of congenital malaria in Nigeria: a multi-centre study. **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. 11, p.1279-1287, 2007.

GALATAS, B. et al. Malaria parasites in the asymptomatic: looking for the hay in the haystack. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 4, p.296-308, 2016.

GUERRA, C. A. et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p.1-11, 2010.

GÜLAŞ, S.; ÖZDENER, N. Congenital malaria: importance of diagnosis and treatment in pregnancy. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 58, p.195-199, 2016.

GETHING, P. W. et al. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p.1-7, 2012.

HUYNH, B. et al. Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 85, n. 2, p.214-220, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 14 jan. 2018.

ISMAIL, M. R. et al. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. **Human Pathology**, v. 1, n. 31, p.85-93, 2000.

KARYANA, M. et al. Malaria morbidity in Papua Indonesia, an area with multidrug resistant *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p.1-10, 2008.

KHAN, W. A. et al. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* malaria in pregnant women in the Chittagong Hill districts of Bangladesh. **Plos One**, v. 9, n. 5, p.1-10, 2014.

KING, C. L. et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p.8363-8368, 2008.

KOURTIS, A. P. et al. Pregnancy and Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 23, p.2211-2218, 2014.

KYES, S. et al. Antigenic variation at the infected red cell surface in Malaria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p.673-707, 2001.

LEE, A. C. et al. Estimates of burden and consequences of infants born small for gestational age in low and middle income countries with INTERGROWTH-21st standard: analysis of CHERG datasets. **Bmj**, v. 358, n. 3677, p.1-11, 2017.

LOPEZ-PEREZ, M. et al. Malaria in pregnancy: a passive surveillance study of pregnant women in low transmission areas of Colombia, Latin America. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p.1-10, 2016.

LUZ, T. C. B. et al. Uncomplicated malaria among pregnant women in the Brazilian Amazon: local barriers to prompt and effective case management. **Acta Tropica**, v. 125, n. 2, p.137-142, 2013.

MACGREGOR, J. D.; AVERY, J. G. Malaria transmission and fetal growth. **British Medical Journal**, v. 3, n. 5928, p.433-436, 1974.

MACHADO FILHO, A. C. et al. Effects of vivax malaria acquired before 20 weeks of pregnancy on subsequent changes in fetal growth. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 2, p.371-376, 2014.

MALHOTRA, I. et al. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? a prospective birth cohort study in Kenya. **Plos Medicine**, v. 6, n. 7, p.1-13, 2009.

MALHOTRA, I. et al. Effect of antenatal parasitic infections on anti-vaccine IgG levels in children: a prospective birth cohort study in Kenya. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p.1-18, 2015.

MARFURT, J. et al. Molecular markers of in vivo *Plasmodium vivax* resistance to Amodiaquine plus Sulfadoxine-Pyrimethamine: mutations in *pvdhfr* and *pvmr1*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 3, p.409-417, 2008.

MARCHESINI, P. et al. A decade of malaria during pregnancy in Brazil: what has been done concerning prevention and management. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p.706-708, 2014.

MATANGILA, J. R. et al. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection is associated with anaemia in pregnancy and can be more cost-effectively detected by rapid diagnostic test than by microscopy in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p.1-10, 2014.

MAYOR, A. et al. Placental infection with *Plasmodium vivax*: a histopathological and molecular study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 12, p.1904-1910, 2012.

MCCLURE, E. M. et al. The association of parasitic infections in pregnancy and maternal and fetal anemia: a cohort study in coastal Kenya. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p.1-5, 2014.

MCGREADY, R. et al. The effects of *P. falciparum* and *P. vivax* infections on placental histopathology in an area of low malaria transmission. **American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 4, n. 70, p.398-407, 2004.

MCGREADY, R. et al. Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: a population-based study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, p.388-396, 2012.

MCKITTRICK, N. D. et al. Parasitic infections in pregnancy decrease placental transfer of Antipneumococcus antibodies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 6, p.1-8, 2017.

MÉNARD, R. et al. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p.701-712, 2013.

MENENDEZ, C. Malaria during pregnancy. **Current Molecular Medicine**, v. 6, n. 2, p.269-273, 2006.

MILLER, L. H. et al. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 6, p.302-304, 1976.

MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p.673-679, 2002.

MOORE, K. et al. Safety of artemisinins in first trimester of prospectively followed pregnancies: an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p.576-583, 2016.

MOORE, K. A. et al. Influence of the number and timing of malaria episodes during pregnancy on prematurity and small-for-gestational-age in an area of low transmission. **Bmc Medicine**, v. 15, n. 1, p.1-12, 2017a.

MOORE, K. et al. Quantification of the association between malaria in pregnancy and stillbirth: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 11, p.1101-1112, 2017b.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p.555-566, 2009.

MURRAY, et al. Differential effect of intrauterine growth restriction on childhood neurodevelopment: a systematic review. **Bjog: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 122, n. 8, p.1062-1072, 2015.

NDAM, N. T. et al. Protective antibodies against placental malaria and poor outcomes during pregnancy, Benin. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p.813-823, 2015.

NOSTEN, F. et al. Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 85, n. 4, p.424-429, 1991.

NOSTEN, F. et al. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. **The Lancet**, v. 354, n. 9178, p.546-549, 1999.

OBSERVATORIO VENEZOLANO DE LA SALUD. **Epidemia de malaria, sin control ni medicamentos, podría llegar a 350 mil casos al finalizar 2016**. 2016. Disponível em: <<https://www.ovsalud.org/noticias/2016/epidemia-malaria-sin-control-ni-medicamentos/>> Acesso em: 17 mai. 2018.

OLUPOT-OLUPOT, P. et al. Neonatal and congenital malaria: a case series in malaria endemic eastern Uganda. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p.1-5, 2018.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological update: increase of malaria in the Americas.** 2018. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14072&Itemid=42346&lang=fr Acesso em: 20 abr. 2018.

PAPAGEORGHIU, A. T. et al. The INTERGROWTH-21 st fetal growth standards: toward the global integration of pregnancy and pediatric care. **American Journal of Obstetrics And Gynecology**, v. 218, n. 2, p.630-640, 2018.

PIÑEROS-JIMÉNEZ, J. G. et al. Reporte de cinco casos de malaria neonatal grave por *Plasmodium vivax* en Urabá, Colombia. **Biomédica**, n. 28, p.471-479, 2008.

PIÑEROS-JIMÉNEZ, J. G. et al. Congenital malaria in Urabá, Colombia. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p.1-8, 2011.

POESPOPRODJO, J. R. et al. Vivax malaria: a major cause of morbidity in early infancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p.1704-1712, 2009.

PRICE, R. N. et al. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p.430-435, 2009.

RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p.1-11, 2017.

REQUENA, P. et al. *Plasmodium vivax* VIR Proteins are targets of naturally-acquired antibody and T cell immune responses to malaria in pregnant women. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p.1-20, 2016.

REQUENA, P. et al. Naturally acquired binding-inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein in pregnant women are associated with higher birth weight in a multicenter study. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 163, p.1-16, 2017.

RIJKEN, M. J. et al. Malaria in pregnancy in the Asia-Pacific region. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p.75-88, 2012.

RILEY, E. M. et al. Do maternally acquired antibodies protect infants from malaria infection? **Parasite Immunology**, v. 23, n. 2, p.51-59, 2001.

ROGERSON, S. J. et al. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p.105-117, 2007.

ROGERSON, S. J.; UNGER, H. W. Prevention and control of malaria in pregnancy – new threats, new opportunities? **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 15, n. 4, p.361-375, 2016.

ROUGEMONT, M. et al. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p.5636-5643, 2004.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p.680-685, 2002.

SALANTI, A. et al. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 9, p.1197-1203, 2004.

SCHWARZ, N. G. et al. Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 8, p.1017-1025, 2008.

SIMISTER, N. Placental transport of immunoglobulin G. **Vaccine**, v. 21, n. 24, p.3365-3369, 2003.

SIMPSON, J. A. et al. Red cell selectivity in malaria: a study of multiple-infected erythrocytes. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p.165-168, 1999.

SIQUEIRA, A. M. et al. Characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. **Bmc Medicine**, v. 13, n. 1, p.1-14, 2015.

SOUZA, R. M. et al. Placental histopathological changes associated with *Plasmodium vivax* infection during pregnancy. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p.1-11, 2013.

SOUZA-SILVA, F. A. et al. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein (DBP) in rural Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p.185-193, 2010.

STAALSOE, T. et al. Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. **The Lancet**, v. 363, n. 9405, p.283-289, 2004.

TEO, A. et al. Decreasing malaria prevalence and its potential consequences for immunity in pregnant women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 9, p.1444-1455, 2014.

TUSTING, L. S. et al. Socioeconomic development as an intervention against malaria: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 382, n. 9896, p.963-972, 2013.

UMBERS, A. J. et al. Malaria in pregnancy: small babies, big problem. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p.168-175, 2011.

UNGER, H. W. et al. Sulphadoxine-pyrimethamine plus azithromycin for the prevention of low birthweight in Papua New Guinea: a randomised controlled trial. **Bmc Medicine**, v. 13, n. 1, p.1-16, 2015.

VICTORA, C. G. et al. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. **International Journal of Epidemiology**, v. 26, n. 1, p.224-227, 1997.

VICTORA, C. G. et al. **Epidemiologia da desigualdade**. 3. ed. São Paulo: Hucitec, 2006. 195p.

VILLAR, J. et al. The objectives, design and implementation of the INTERGROWTH-21st Project. **Bjog: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 120, n. 2, p.9-26, 2013.

WAGNER, G. et al. High incidence of asymptomatic malaria infections in a birth cohort of children less than one year of age in Ghana, detected by multicopy gene polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p.115-123, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global technical strategy for malaria 2016-2030**.

2015. Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176712/9789241564991_eng.pdf?sequence=1> Acesso em: 14 dez. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malária report 2016**. Geneva, 2016a.

Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252038/9789241511711-eng.pdf?sequence=1>> Acesso em: 20 abr. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Country profiles – Brazil**. 2016b. Disponível em:

<http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_bra_en.pdf?ua=1> Acesso em: 19 mar. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malária report 2017**. Geneva, 2017.

Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf?sequence=1>> Acesso em: 20 abr. 2018.

WYLIE, Blair J et al. Gestational age assessment in malaria pregnancy cohorts: a prospective ultrasound demonstration project in Malawi. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p.1-11, 2013.

YANOW, S. K. et al. Impact of malaria in pregnancy as Latin America approaches elimination. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 5, p.416-427, 2016.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA

**Saúde e Nutrição Materno-Infantil em Cruzeiro do Sul, Acre:
Estudo Longitudinal de Base Populacional**

Pesquisadora responsável:

Profa. Dra. Marly Augusto Cardoso

OBJETIVOS E PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Este estudo tem por objetivo principal **estudar os fatores que influenciam a saúde e a nutrição de crianças de Cruzeiro do Sul desde o início de suas vidas, ainda no período da gestação**. Com as mudanças que observamos nas condições de saúde da nossa população, estudos com essa finalidade são importantes para identificar como prevenir o quanto antes a ocorrência de doenças e infecções, assim como o risco para deficiências nutricionais e distúrbios metabólicos, tanto em gestantes como em seus bebês.

Para isso, nosso estudo inclui três fases:

- 1 Primeiro, nossa equipe de pesquisa, em parceria com agentes de saúde, realizará visitas domiciliares no município para **identificar todas as gestantes com idade gestacional de até 20 semanas**. Essas gestantes serão convidadas a participar do estudo e a responder um questionário inicial sobre a data de sua última menstruação e seus **dados socioeconômicos, demográficos e obstétricos**.
- 2 Segundo, serão agendadas duas **avaliações clínicas, entre 16-20ª semanas e entre 24-28ª semanas de gestação**, no Posto de Saúde do Agricultor. Em cada avaliação, nossa equipe de pesquisa realizará **exame de ultrassonografia** do bebê, medidas de **peso e altura** e coleta de **amostra de sangue venoso** (cerca de 12 mL) da gestante.
O exame de ultrassom será importante para acompanhar o crescimento e o desenvolvimento do bebê no útero da mãe. A amostra de sangue será colhida em jejum de oito horas para realizar hemograma completo, avaliar a presença de anemia, dosar vitaminas A, D e ácido fólico, glicose, insulina e detectar infecção por malária.
- 3 Terceiro, no **momento do parto no Hospital da Mulher e da Criança do Juruá**, nossa equipe registrará o **tipo de parto, idade gestacional, sexo, peso e comprimento do bebê**. Após o nascimento, será necessário colher uma **amostra de sangue do cordão umbilical** (cerca de 12 mL) e de **uma gota de sangue da placenta**. Também serão coletadas informações sobre possíveis problemas que ocorreram na gestação e sobre qualquer dificuldade que a gestante tenha apresentado para enxergar claramente no período.

A coleta de amostras de sangue do cordão umbilical e da placenta ocorrerá após o parto; portanto, não será dolorosa nem para a mãe e nem para seu bebê. Esse material será muito importante para dosar vitaminas e minerais, avaliar características genéticas e presença de malária no bebê recém-nascido.

BENEFÍCIOS E RISCOS EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Ao participar da pesquisa, a gestante e seu bebê terão avaliação nutricional gratuita por equipe especializada, com **acesso aos resultados de exames individuais**, que ficarão arquivados no seu prontuário do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá e/ou nos postos de saúde.

O desconforto esperado com a participação neste estudo refere-se apenas à coleta de sangue venoso que utilizará profissionais treinados e material descartável. Por isso, os riscos são mínimos e comparáveis a qualquer outra coleta de sangue em laboratórios de análises clínicas.

GARANTIAS, ESCLARECIMENTOS E RECUSA EM PARTICIPAR

Você poderá tirar dúvidas e será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto necessário. Você **é livre para se recusar a participar**. Depois de aceitar participar, você também pode retirar o seu consentimento e **interromper sua participação a qualquer momento, sem nenhum prejuízo** em seu atendimento nos postos de saúde de Cruzeiro do Sul e no Hospital da Mulher e da Criança do Juruá.

Sua participação é voluntária, totalmente confidencial e não acarretará qualquer custo para você. Quando os dados coletados forem utilizados pela equipe de pesquisa neste estudo, os nomes dos participantes nunca serão revelados. Os dados ou o material biológico obtidos neste estudo poderão ser utilizados em outros projetos, com a devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu,

_____, portadora da identidade _____, nascida em ____/____/_____, fui informada de maneira clara e detalhada sobre os objetivos da pesquisa “*Saúde e Nutrição Materno-Infantil em Cruzeiro do Sul, Acre: Estudo Longitudinal de Base Populacional*”. Após ler e receber explicações sobre a pesquisa, e ter meus direitos de:

1. Receber resposta a qualquer pergunta e esclarecimento sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados à pesquisa;
2. Retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;
3. Não ser identificada e ser mantido o caráter confidencial das informações relacionadas à privacidade;

Declaro que concordo em participar desse estudo, que recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido, e que me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Cruzeiro do Sul, ____/ ____/ ____.

Profa. Dra. Marly Augusto Cardoso

Assinatura da participante ou *Impressão do polegar direito*

Pesquisador de campo: _____

Telefone: (68) _____

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIOS

QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO E HISTÓRIA DE SAÚDE

ID: _____

Nome: _____

Endereço completo: _____

Ponto de referência: _____

Telefone fixo: () _____ - _____ () _____ - _____ obs: _____

Telefone celular: () _____ - _____ () _____ - _____ obs: _____

Telefones adicionais: () _____ - _____; falar com _____ (relação: _____)

() _____ - _____; falar com _____ (relação: _____)

Entrevistador: _____ Data da entrevista: ____/____/____

Nº cartão SUS: _____ Nº SIVEP (notificação malária): _____

Data de nascimento da gestante: ____/____/____ Conferir em documento oficial

Data da última menstruação: ____/____/____

Idade gestacional estimada: [] [] semanas

BLOCO 1 – DADOS DOMICILIARES, SOCIOECONÔMICOS E AMBIENTAIS

As perguntas a seguir serão sobre algumas características do domicílio em que a senhora mora:

1. Este domicílio é:

0 | | Próprio 1 | | Alugado 2 | | Cedido 3 | | Outro, especifique _____

2. Tipo de domicílio:

0 | | Casa de alvenaria 1 | | Casa de madeira
2 | | Cômodo/quarto 3 | | Outro, especifique _____

3. Quantas pessoas moram em seu domicílio?

[] [] pessoas

4. Quantos cômodos tem este domicílio?

[] [] cômodos

5. De onde é proveniente a água utilizada neste domicílio para beber e no preparo de alimentos?

0 | | Rede geral de distribuição 1 | | Poço/nascente
2 | | Rio/igarapé 3 | | Comprada/mineral
4 | | Outro, especifique _____

6. Qual o destino do lixo gerado no domicílio?

0 | | Coletado 1 | | Enterrado

- 2 | ☐ Queimado 3 | ☐ Descartado em terreno baldio
 4 | ☐ Descartado em rio/igarapé 5 | ☐ Outro, especifique _____

7. Para onde vai o esgoto de sua casa?

- 0 | ☐ Rede de esgoto 1 | ☐ Fossa séptica
 2 | ☐ Fossa rudimentar 3 | ☐ Vala a céu aberto
 4 | ☐ Rio/igarapé 5 | ☐ Recolhido por caminhão (tatuzão)
 6 | ☐ Outro, especifique _____

8. Este domicílio tem energia elétrica?

- 0 | ☐ Não 1 | ☐ Sim

9. Sua casa foi borrifada pela equipe de controle de malária ou dengue?

- 0 | ☐ Não 1 | ☐ Sim, quando foi realizada a última borrifação (mês/ano)? ____/____

10. Há cão ou gato no seu domicílio?

- a) Cão: 0 | ☐ Não 1 | ☐ Sim
 b) Gato: 0 | ☐ Não 1 | ☐ Sim

11. Há horta ou pomar em seu domicílio?

- 0 | ☐ Não 1 | ☐ Sim

12. Quais dos bens abaixo existem em seu domicílio?

a) Televisão	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
b) Aparelho de som	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
c) Computador	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
d) Aparelho de DVD	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
e) Internet	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
f) TV a cabo	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
g) Fogão a gás	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
h) Geladeira	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
i) Liquidificador	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
j) Ferro elétrico	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
k) Máquina de lavar roupa	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
l) Microondas	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
m) Jogo de sala/estofado	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
n) Telefone fixo	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
o) Telefone celular	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
p) Bicicleta	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
q) Motocicleta	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
r) Carro	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
s) Dono de terra/colônia	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
t) Dono de gado	0 ☐ Não	1 ☐ Sim

13. Quem é considerado(a) o(a) chefe/responsável pela família em seu domicílio?

- 0 | ☐ A mesma 1 | ☐ Companheiro 2 | ☐ Outro, especifique _____

14. Caso não seja a senhora, o chefe/responsável pela família frequentou a escola?

- 0 | ☐ Não, e não sabe ler ou escrever
 1 | ☐ Não, mas sabe ler e escrever
 2 | ☐ Sim. Até que série completou os estudos? ____ série ____ grau

15. A senhora frequentou a escola?0 | ☐ Não, e não sabe ler ou escrever1 | ☐ Não, mas sabe ler e escrever2 | ☐ Sim. Até que série completou os estudos? ____ série ____ grau**16. Qual a sua ocupação atual?**0 | ☐ Dona de casa1 | ☐ Doméstica, faxineira, serviços gerais2 | ☐ Comércio3 | ☐ Agricultura4 | ☐ Serviços técnicos (escola, secretaria, etc)5 | ☐ Assistencial (igrejas, entidades, etc)6 | ☐ Outro, especifique _____**17. A senhora (e/ou sua família) é beneficiária/recebe:**a) Programa Bolsa Família 0 | ☐ Não 1 | ☐ Sim Período: _____b) Seguro desemprego 0 | ☐ Não 1 | ☐ Sim Período: _____c) Aposentadoria 0 | ☐ Não 1 | ☐ Sim Período: _____d) Pensão alimentícia 0 | ☐ Não 1 | ☐ Sim Período: _____e) Outro: _____ 0 | ☐ Não 1 | ☐ Sim Período: _____**BLOCO 2 – DADOS SOBRE ESTILO DE VIDA E ANTECEDENTES PESSOAIS DA GESTANTE***As perguntas a seguir dizem respeito à senhora e alguns de seus hábitos:***18. Há quanto tempo a senhora mora nesta cidade?**0 | ☐ Menos de 1 ano1 | ☐ Entre 1 e 5 anos2 | ☐ Mais de 5 anos3 | ☐ Desde que nasceu**19. A senhora está casada ou mora com um companheiro?**0 | ☐ Não1 | ☐ Sim, período: _____**20. Considerando o período de toda sua vida, a senhora já fumou mais de 20 maços de cigarro, cachimbo ou charuto?**0 | ☐ Não1 | ☐ Sim, mas parou de fumar2 | ☐ Sim e fuma atualmente**21. Se a senhora fuma ou fumou, por quanto tempo fuma/fumou?**

|_|_| anos

|_|_| meses

22. Se a senhora parou de fumar, há quanto tempo isso ocorreu?

|_|_| anos

|_|_| meses

23. Se a senhora fuma ou fumou, quantos cigarros, cachimbos ou charutos em média a senhora fuma ou fumava por dia?

a) Cigarros: | | | unidades por dia

b) Cachimbos: | | | unidades por dia

c) Charutos: | | | unidades por dia

24. Existem fumantes em seu domicílio?0 | ☐ Não1 | ☐ Sim**25. Considerando os últimos três meses, a senhora consumiu bebidas alcoólicas (por exemplo, cerveja, vinho, champagne, licor, pinga, uísque, vodca, vermouths, caninha, rum, tequila, gin)?**0 | ☐ Não, nunca consumiu1 | ☐ Sim, 1 ou 2 vezes2 | ☐ Sim, mensalmente3 | ☐ Sim, semanalmente4 | ☐ Sim, diariamente ou quase todos os dias

26. Considerando os últimos três meses, a senhora fez uso de alguma droga ilícita (por exemplo, maconha, cocaína, crack, anfetaminas, êxtase, inalantes, sedativos, alucinógenos, opioides, sem prescrição por médico)?

0 Não, nunca fez uso	1 Sim, 1 ou 2 vezes
2 Sim, mensalmente	3 Sim, semanalmente
4 Sim, diariamente ou quase todos os dias	

27. Se a senhora está casada ou mora com um companheiro, o companheiro da senhora consome ou faz uso de:

a) Cigarro	0 Não	1 Sim, esporadicamente	2 Sim, sempre/com frequência
b) Bebidas alcoólicas	0 Não	1 Sim, esporadicamente	2 Sim, sempre/com frequência
c) Drogas ilícitas	0 Não	1 Sim, esporadicamente	2 Sim, sempre/com frequência

28. Em média, quantas horas a senhora costuma dormir diariamente?

|_| horas

29. A senhora já apresentou alguma das seguintes condições ou problemas de saúde?

a) Pressão alta (hipertensão arterial crônica)	0 Não	1 Sim
b) Diabetes	0 Não	1 Sim
c) Cardiopatias, incluindo doença de Chagas	0 Não	1 Sim
d) Doença renal crônica	0 Não	1 Sim
e) Anemias ou deficiência de nutrientes	0 Não	1 Sim
f) Baixo peso ou desnutrição	0 Não	1 Sim
g) Sobrepeso ou obesidade	0 Não	1 Sim
h) Epilepsia	0 Não	1 Sim
i) Doenças da tireoide ou outros distúrbios hormonais	0 Não	1 Sim
j) Hepatite	0 Não	1 Sim
k) Tuberculose	0 Não	1 Sim
l) Malária	0 Não	1 Sim
m) Doenças sexualmente transmissíveis	0 Não	1 Sim
n) Portadora de infecção pelo HIV	0 Não	1 Sim
o) Doenças neurológicas e psiquiátricas	0 Não	1 Sim
p) Câncer ou doenças neoplásicas	0 Não	1 Sim
q) Doenças respiratórias	0 Não	1 Sim
r) Outra: _____		

30. A senhora já foi internada?

0 Não	1 Sim, especifique:

Motivo: _____	Idade: _____
Motivo: _____	Idade: _____
Motivo: _____	Idade: _____
Motivo: _____	Idade: _____
Motivo: _____	Idade: _____

31. A senhora já fez alguma cirurgia?

0 Não	1 Sim, especifique:

Motivo: _____	Idade: _____
Motivo: _____	Idade: _____
Motivo: _____	Idade: _____
Motivo: _____	Idade: _____
Motivo: _____	Idade: _____

32. A senhora faz uso de algum remédio/medicamento ou suplemento/vitamina regularmente?

0 Não	1 Sim, especifique:

Nome: _____ Posologia: _____
 Nome: _____ Posologia: _____
 Nome: _____ Posologia: _____
 Nome: _____ Posologia: _____
 Nome: _____ Posologia: _____

BLOCO 3 – HISTÓRIA OBSTÉTRICA DA GESTANTE

As perguntas a seguir dizem respeito ao seu histórico de gestações:

33. A sua primeira menstruação veio com quantos anos?

|_|_| anos

34. Quando a senhora menstruava, seus ciclos menstruais eram regulares? De quantos em quantos dias?

0 | | Não, menstruações irregulares 1 | | Sim, menstruações regulares a cada ____ dias

35. Quando ficava menstruada, quantos dias durava cada menstruação?

0 | | Duração irregular 1 | | Ciclos regulares, durante ____ dias

36. A senhora fazia uso de algum método para evitar gravidez (métodos anticoncepcionais)?

0 | | Não 1 | | Sim, qual(is): _____

37. A senhora já fez exame de Papanicolaou?

0 | | Não 1 | | Sim, quantas vezes: ____ vezes

38. Esta foi uma gestação planejada pela senhora (e seu companheiro)?

0 | | Não 1 | | Sim

39. Esta é a primeira gestação da senhora?

0 | | Não 1 | | Sim

40. Se já ficou grávida, quantas vezes ao todo com esta gravidez (incluindo abortos, natimortos, etc)?

|_|_| vezes

41. Se a senhora já ficou grávida, qual era sua idade na primeira gestação?

|_|_| anos

42. Quantos filhos nasceram vivos?

|_|_| filhos

43. História de nascimentos – sobre os seus filhos que nasceram vivos:

	Data de nascimento	Sexo da criança	Tipo de parto	Peso ao nascer	Prematuro?	Está vivo (atualmente)?
a)	___/___/___	_ Feminino Masculino	_ Normal Fórceps _ Cesárea	_____g	_ Não _ Sim	_ Não, especifique o ano de falecimento: ____ _ Sim
b)	___/___/___	_ Feminino Masculino	_ Normal Fórceps _ Cesárea	_____g	_ Não _ Sim	_ Não, especifique o ano de falecimento: ____ _ Sim
c)	___/___/___	_ Feminino Masculino	_ Normal Fórceps _ Cesárea	_____g	_ Não _ Sim	_ Não, especifique o ano de falecimento: ____ _ Sim
d)	___/___/___	Feminino _ Masculino	_ Normal _ Fórceps	_____g	_ Não _ Sim	Não, especifique o ano de falecimento: ____

e) ____/____/____	☐ Feminino ☐ Masculino	☐ Cesárea ☐ Normal ☐ Fórceps ☐ Cesárea	_____g	☐ Não ☐ Sim	☐ Sim ☐ Não, especifique o ano de falecimento: _____ ☐ Sim
f) ____/____/____	☐ Feminino ☐ Masculino	☐ Normal ☐ Fórceps ☐ Cesárea	_____g	☐ Não ☐ Sim	☐ Não, especifique o ano de falecimento: _____ ☐ Sim
g) ____/____/____	☐ Feminino ☐ Masculino	☐ Normal ☐ Fórceps ☐ Cesárea	_____g	☐ Não ☐ Sim	☐ Não, especifique o ano de falecimento: _____ ☐ Sim
h) ____/____/____	☐ Feminino ☐ Masculino	☐ Normal ☐ Fórceps ☐ Cesárea	_____g	☐ Não ☐ Sim	☐ Não, especifique o ano de falecimento: _____ ☐ Sim
i) ____/____/____	☐ Feminino ☐ Masculino	☐ Normal ☐ Fórceps ☐ Cesárea	_____g	☐ Não ☐ Sim	☐ Não, especifique o ano de falecimento: _____ ☐ Sim
j) ____/____/____	☐ Feminino ☐ Masculino	☐ Normal ☐ Fórceps ☐ Cesárea	_____g	☐ Não ☐ Sim	☐ Não, especifique o ano de falecimento: _____ ☐ Sim

BLOCO 4 – DADOS E CUIDADO PRÉ-NATAL REFERENTES À GESTAÇÃO ATUAL

As perguntas a seguir dizem respeito à sua gestação atual:

44. A senhora já iniciou os atendimentos de cuidado pré-natal na gestação atual?

0 ☐ Não

1 ☐ Sim

45. Caso sim, em qual mês ou semana de gestação foi realizada a primeira consulta pré-natal?

☐ mês

☐ semana

46. Caso sim, quantas consultas foram realizadas até o momento?

☐ consultas

47. Caso sim, onde a senhora está realizando o acompanhamento pré-natal?

0 ☐ Serviço público

1 ☐ Serviço particular/convênio

2 ☐ Outro, especifique _____

48. Qual é a cor de pele da gestante?

0 ☐ Branca

1 ☐ Negra

2 ☐ Parda

3 ☐ Indígena

4 ☐ Amarela

5 ☐ Outro, especifique _____

49. Qual é a cor de pele do pai biológico do bebê (gestação atual)?

0 ☐ Branca

1 ☐ Negra

2 ☐ Parda

3 ☐ Indígena

4 ☐ Amarela

5 ☐ Outro, especifique _____

9 ☐ Não sabe

FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO NO PARTO

ID: _____

Nome: _____

Endereço completo: _____

Ponto de referência: _____

Telefone fixo: () _____ - _____ () _____ - _____ obs: _____

Telefone celular: () _____ - _____ () _____ - _____ obs: _____

Telefones adicionais: () _____ - _____; falar com _____ (relação: _____)

() _____ - _____; falar com _____ (relação: _____)

Entrevistador: _____ Data da entrevista: ____/____/____

Nº cartão SUS: _____ Nº SIVEP (notificação malária): _____

Desfecho da gestação

Em intimações para parto de gestantes residentes em Cruzeiro do Sul, registrar o desfecho:

- 0 ☐ Parto nascido vivo >> *Completar todas as questões do formulário*
- 1 ☐ Parto natimorto >> *Questões 13, 30-34, 38-41 não se aplicam*
- 2 ☐ Morte materna no parto >> *Questões 5, 6, 8-13, 38, 42 não se aplicam*
- 3 ☐ Aborto, causa _____ >> *Questões 13, 20-34, 38-41 não se aplicam*

BLOCO 1 – DADOS DA GESTANTE/PUÉRPERA

O cartão da gestante/pré-natal deve ser solicitado à puérpera junto ao leito no setor do Alojamento Conjunto, para consulta em conjunto à coleta de dados do Bloco 1. Ao final das questões, realizar a digitalização do cartão.

1. A senhora realizou atendimentos de cuidado pré-natal durante a gestação?

0 ☐ Não 1 ☐ Sim

2. Caso sim, quantas consultas foram realizadas?

Verificar anotações no cartão da gestante

consultas

3. Caso sim, onde a senhora realizou o acompanhamento pré-natal?

- 0 ☐ Serviço público, especifique o nome do posto de saúde _____
- 1 ☐ Serviço particular/convênio, especifique o nome do médico _____
- 2 ☐ Outro, especifique _____

4. Durante o acompanhamento pré-natal, a senhora fez uso de algum suplemento/vitamina?

Verificar anotações no cartão da gestante

0 ☐ Não 1 ☐ Sim, especifique:

Nome: _____	Posologia: _____	Em qual(is) trimestre(s) _____
Nome: _____	Posologia: _____	Em qual(is) trimestre(s) _____
Nome: _____	Posologia: _____	Em qual(is) trimestre(s) _____
Nome: _____	Posologia: _____	Em qual(is) trimestre(s) _____
Nome: _____	Posologia: _____	Em qual(is) trimestre(s) _____

5. Avaliação funcional da deficiência de vitamina A:

Durante o período da gestação,

a) A senhora tem dificuldade para enxergar durante o dia?	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
b) A senhora teve dificuldade para enxergar com pouca luz ou à noite?	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
c) A senhora teve cegueira noturna?	0 ☐ Não	1 ☐ Sim

6. A senhora recebeu dose de vitamina A após o parto (cápsula vermelha)?

0 ☐ Não1 ☐ Sim**7. Alguma intercorrência ocorreu durante a gestação até o momento do parto?***Verificar anotações no cartão da gestante*

a) Hemorragia	0 ☐ Não	1 ☐ Sim	Em qual(is) trimestre(s) _____
b) Inchaço nas pernas	0 ☐ Não	1 ☐ Sim	Em qual(is) trimestre(s) _____
c) Pressão alta	0 ☐ Não	1 ☐ Sim	Em qual(is) trimestre(s) _____
d) Anemia	0 ☐ Não	1 ☐ Sim	Em qual(is) trimestre(s) _____
e) Diabetes	0 ☐ Não	1 ☐ Sim	Em qual(is) trimestre(s) _____
f) Infecção urinária	0 ☐ Não	1 ☐ Sim	Em qual(is) trimestre(s) _____
g) Malária	0 ☐ Não	1 ☐ Sim	Em qual(is) trimestre(s) _____
h) Outro, especifique _____			Em qual(is) trimestre(s) _____

8. A senhora recebeu assistência odontológica durante a gestação, na atenção pré-natal? Realizou consulta com dentista?0 ☐ Não1 ☐ Sim**9. Caso tenha recebido assistência odontológica:**

a) Foi somente um exame de boca, gengiva e dentes?	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
b) Envolveu tratamento dentário?	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
c) Outro, especifique _____		

10. Caso tenha recebido assistência odontológica, qual foi o número de consultas com dentista durante a gestação? consultas**11. Caso tenha recebido assistência odontológica, como a senhora percebe as mudanças na saúde de sua boca desde a conclusão do tratamento?**0 ☐ Piorou muito 1 ☐ Piorou um pouco 2 ☐ Razoável 3 ☐ Melhorou um pouco 4 ☐ Melhorou muito**12. Como a senhora classifica a saúde de seus dentes e sua boca hoje?**0 ☐ Muito ruim 1 ☐ Ruim 2 ☐ Razoável 3 ☐ Boa 4 ☐ Excelente**13. Seu bebê foi amamentado no primeiro dia de vida (primeiras 24 horas após o parto)?**0 ☐ Não1 ☐ Sim**14. Resultados de testes no pré-natal:***Verificar anotações no cartão da gestante*

a) HbsAG	0 ☐ Negativo	1 ☐ Positivo	9 ☐ Sem informações
b) Toxoplasmose	0 ☐ IgG	1 ☐ IgM	9 ☐ Sem informações
c) HIV	0 ☐ NRT	1 ☐ RT	9 ☐ Sem informações
d) Citomegalovírus	0 ☐ IgG	1 ☐ IgM	9 ☐ Sem informações
e) Rubéola	0 ☐ IgG	1 ☐ IgM	9 ☐ Sem informações
f) Outro, especifique _____			

15. Digitalização do cartão da gestante/pré-natal:0 ☐ Não realizada1 ☐ Realizada**BLOCO 2 – DADOS DO PRONTUÁRIO: PARTO E RECÉM-NASCIDO**

A consulta ao prontuário deve ser solicitada ao posto de enfermagem do Alojamento Conjunto. Realizar a digitalização do prontuário e anotar as informações a seguir.

16. Digitalização da ficha da maternidade/prontuário de atendimento:0 ☐ Não realizada1 ☐ Realizada*Prontuário: ficha de classificação de risco da gestante***17. Data de nascimento da mãe:** ____/____/____**18. Peso gestacional final:** ____/____, ____/____ kg

- Fator RH da criança	0 ☐ Negativo	1 ☐ Positivo	9 ☐ Sem informações
c) VDRL	0 ☐ NRT	1 ☐ RT	9 ☐ Sem informações
d) Teste rápido	0 ☐ NRT	1 ☐ RT	9 ☐ Sem informações
e) Outro, especifique _____			

Prontuário: ficha de evolução da gestante/puérpera

36. Durante o parto ou após os procedimentos do parto, a gestante apresentou algum problema de saúde?

a) Hemorragia	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
b) Febre	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
c) Pressão alta	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
d) Convulsão	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
e) Hemotransusão	0 ☐ Não	1 ☐ Sim
f) Outro, especifique _____		

37. Resultados de hemograma materno disponíveis?

0 ☐ Não 1 ☐ Sim

a) Hemáceas	_____._____._____ x milhões/uL
b) Hemoglobina	_____._____._____ g/dL
c) Hematócrito	_____._____._____ %
d) VCM	_____._____._____ fL
e) HCM	_____._____._____ pg
f) CHCM	_____._____._____ g/dL
g) Leucócitos	_____._____._____/mm ³
h) Eosinófilos	_____._____ %
i) Bastões	_____._____ %
j) Neutrófilos	_____._____ %
k) Linfócitos	_____._____ %
l) Monócitos	_____._____ %
m) Mielócitos	_____._____ %
n) Metamielócitos	_____._____ %
o) Plaquetas	_____._____._____/mm ³

Livro de registro do Centro Obstétrico/Centro Cirúrgico

38. Houve contato pele a pele entre mãe e recém-nascido?

0 ☐ Não 1 ☐ Sim

39. O recém-nascido foi amamentado na primeira hora após o parto?

0 ☐ Não 1 ☐ Sim

SAME – informações após alta hospitalar

40. Quantos dias o recém-nascido ficou internado?

_____._____ dias

41. Ocorreu óbito do recém-nascido após o parto, durante a internação?

0 ☐ Não 1 ☐ Sim, data ____/____/____; causa _____

42. Ocorreu óbito da puérpera após o parto, durante a internação?

0 ☐ Não 1 ☐ Sim, data ____/____/____; causa _____

BLOCO 3 – COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO NA MATERNIDADE

43. Coleta de sangue materno/papa de hemáceas:

0 ☐ Não realizada 1 ☐ Realizada

44. Gota espessa do sangue periférico materno:

0 ☐ Não1 ☐ Sim**45. Coleta de sangue do cordão umbilical:**0 ☐ Não realizada1 ☐ Realizada**46. Gota espessa do sangue do cordão umbilical:**0 ☐ Não1 ☐ Sim

ANEXO 1 – PLASMÍDEOS

Plasmid DNA Description:

The synthetic gene *P_vivax* was assembled from synthetic oligonucleotides and/or PCR products. The fragment was inserted into pMA-T. The plasmid DNA was purified from transformed bacteria and concentration determined by UV spectroscopy. The final construct was verified by sequencing. The sequence congruence within the insertion sites was 100%. See the accompanying data sheets for sequences and find the original ABI trace files as well as the assembled sequences electronically on disk. 5 µg of the plasmid preparation were lyophilized for shipping.

Plasmid Map:

invitrogen
by Thermo Fisher Scientific

Quality Assurance Documentation: 16ACFUOC

Ref. No.: 1932145

Designation:	E. coli K12 OmniMAX™ 2 T1R
Gene name:	P_vivax
Gene size:	360 bp
Vector backbone:	pMA-T
Cloning sites:	SfiI / SfiI
Quantity:	~5 µg Plasmid DNA
Note:	Please dissolve lyophilized DNA in 50 µl distilled water or 10 mM Tris-HCl (pH 8.0). We recommend sequence verification after each transformation step.
Date:	1 July 2016
Anja Philipps	Quality control

Plasmid DNA Description:

The synthetic gene *P_falciparum* was assembled from synthetic oligonucleotides and/or PCR products. The fragment was inserted into pMA-T. The plasmid DNA was purified from transformed bacteria and concentration determined by UV spectroscopy. The final construct was verified by sequencing. The sequence congruence within the insertion sites was 100%. See the accompanying data sheets for sequences and find the original ABI trace files as well as the assembled sequences electronically on disk. 5 µg of the plasmid preparation were lyophilized for shipping.

Plasmid Map:

invitrogen
by Thermo Fisher Scientific

Quality Assurance Documentation: 16ACFUNC

Ref. No.: 1932144

Designation:	E. coli K12 OmniMAX™ 2 T1R
Gene name:	P_falciparum
Gene size:	357 bp
Vector backbone:	pMA-T
Cloning sites:	SfiI / SfiI
Quantity:	~5 µg Plasmid DNA
Note:	Please dissolve lyophilized DNA in 50 µl distilled water or 10 mM Tris-HCl (pH 8.0). We recommend sequence verification after each transformation step.
Date:	29 June 2016
Felix Mader	Quality control

Plasmid DNA Description:

The synthetic gene *P_malariae* was assembled from synthetic oligonucleotides and/or PCR products. The fragment was inserted into pMA-T. The plasmid DNA was purified from transformed bacteria and concentration determined by UV spectroscopy. The final construct was verified by sequencing. The sequence congruence within the insertion sites was 100%. See the accompanying data sheets for sequences and find the original ABI trace files as well as the assembled sequences electronically on disk. 5 µg of the plasmid preparation were lyophilized for shipping.

Plasmid Map:

invitrogen
by Thermo Fisher Scientific

Quality Assurance Documentation: 17ABUNSC

Ref. No.: 2131923

Designation:	E.coli K12 OmniMAX™ 2 T1R
Gene name:	P_malariae
Gene size:	350 bp
Vector backbone:	pMA-T
Cloning sites:	SfiI / SfiI
Quantity:	~5 µg Plasmid DNA
Note:	Please dissolve lyophilized DNA in 50 µl distilled water or 10 mM Tris-HCl (pH 8.0). We recommend sequence verification after each transformation step.
Date:	6 June 2017
Felix Mader	Quality control

www.thermofisher.com

geneartsupport@thermofisher.com

The Hidden Burden of *Plasmodium vivax* Malaria in Pregnancy in the Amazon: An Observational Study in Northwestern Brazil

Anaclara Pincelli,¹ Paulo A. R. Neves,² Barbara H. Lourenço,^{2,3} Rodrigo M. Corder,¹ Máira B. Malta,² Juliana Sampaio-Silva,² Rodrigo M. de Souza,⁴ Marly A. Cardoso,² Marcia C. Castro,⁵ and Marcelo U. Ferreira^{1*} for the MINA Brazil Working Group

¹Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Department of Preventive Medicine, Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁴Multidisciplinary Center, Federal University of Acre, Cruzeiro do Sul, Brazil; ⁵Department of Global Health and Population, Harvard T. H. Chan School of Public Health, Boston, Massachusetts

Abstract. We measured the prevalence of malaria in pregnancy and estimated its impact on birth weight and length and maternal hemoglobin in 1,180 women from Juruá Valley, the main malaria hotspot in Brazil. Antenatal malaria episodes, 74.6% of them due to *Plasmodium vivax*, were microscopically diagnosed in 8.0% of the women and were associated with an average reduction in birth weight z-scores of 0.35 (95% confidence interval [CI] = 0.14–0.57) and in birth length z-scores of 0.31 (95% CI = 0.08–0.54), compared with malaria-free pregnancies. Affected mothers had a mean decrease in hemoglobin concentration at delivery of 0.33 g/100 mL (95% CI = 0.05–0.62 g/100 mL); 51.6% were anemic. The timing and frequency of antenatal infections influenced pregnancy outcomes and first- or second-trimester infections were not associated with decreased birth weight and length and maternal hemoglobin at delivery. Although repeated antenatal vivax infections were associated with poorer birth outcomes, even a single vivax malaria episode was associated with a significant reduction in birth weight and length and maternal hemoglobin. Overall, 7.5% women had the parasite's DNA found in peripheral blood at delivery. Most (83.1%) of these 89 perinatal infections were due to *P. vivax* and only 7.9% of them progressed to symptomatic disease after delivery. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA was found in 0.6% and 0.3% of 637 cord blood samples examined, respectively, but only one newborn developed clinical neonatal malaria. Our results further challenge the notion that vivax malaria is relatively benign during pregnancy and call for better strategies for its prevention.

INTRODUCTION

More than 125 million pregnant women are globally at risk of malaria each year.¹ Malaria in pregnancy (MiP) is associated with a wide range of adverse outcomes for the mother, the fetus, and the neonate. In fact, stillbirth, miscarriage, low birth weight (LBW) caused by either intrauterine growth restriction or preterm birth, increased neonatal and maternal mortality, and reduced growth and neurocognitive function in early childhood are all well-known MiP complications.² The public health burden of MiP has been mostly investigated in malaria-endemic settings dominated by *Plasmodium falciparum* across Africa, Asia, and the Southwest Pacific.^{2–4}

The clinical implications of malaria during pregnancy remain understudied in low-endemicity regions where *Plasmodium vivax* predominates, such as Latin America.^{2,5,6} This is partially due to the fact that infections with *P. vivax* are believed to cause less severe clinical consequences in pregnant women than those with *P. falciparum*, although an increased risk of LBW and anemia associated with infection has been documented in large studies.^{2,5,7–10} Erythrocytes parasitized with the former species do not sequester massively in the intervillous spaces as they do in *P. falciparum* infections,^{11,12} but some MiP-associated histological changes in the placenta, such as syncytial knotting and increased thickness of the placental barrier, have been recently documented in Brazil^{12,13} and may affect fetal nutrition and growth because of impaired transport and secretory functions.¹⁴ Because primaquine (PQ) cannot be administered during pregnancy,¹⁵ repeated MiP

episodes due to *P. vivax* hypnozoite reactivation are relatively common and may adversely affect birth outcomes.

The 6,000–9,000 laboratory-confirmed MiP cases that are officially notified in Brazil each year, more than two-thirds of them caused by *P. vivax*, represent 4–6% of all malaria cases in the country.¹⁶ More than 99% of these cases occur in the Amazon.¹⁶ Intermittent preventive treatment during antenatal care visits is not recommended in this country, but pregnant women from malaria-endemic areas of Brazil must be screened for malaria parasites by conventional microscopy or rapid diagnostic tests at every antenatal care visit and receive supervised antimalarial treatment whenever infection is laboratory-confirmed.¹⁵ However, antenatal care providers often fail to perceive MiP as a major preventable and treatable cause of morbidity in pregnant women and their offspring, and routine prenatal malaria testing, although formally recommended by the Ministry of Health, remains infrequent.¹⁷ Moreover, available diagnostics often fail to detect peripheral parasitemias at delivery, either symptomatic or not, that are later diagnosed by more sensitive molecular methods,¹⁸ further contributing to MiP underreporting.

Here, we investigated the burden of MiP in Juruá Valley, the main residual malaria hotspot in Brazil, where *P. vivax* is the dominant malaria parasite species. We combine microscopy-based diagnosis throughout pregnancy with molecular diagnosis at delivery to measure MiP prevalence and estimate its impact on fetal growth and maternal anemia in the largest Amazonian sample of malaria-exposed pregnant women thus far studied.

PATIENTS AND METHODS

Study site. Cruzeiro do Sul (07°37'S and 72°40'W), with 82,075 inhabitants, is the most populated municipality of

* Address correspondence to Marcelo U. Ferreira, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, Brazil. E-mail: muferrrei@usp.br

Juruá Valley, northwestern Brazil. It currently accounts for 15.2% of the malaria burden countrywide, with 16,721 laboratory-confirmed cases in 2016—three-fourths due to *P. vivax* and one-fourth due to *P. falciparum*, with rare *Plasmodium malariae* infections (Ministry of Health of Brazil, unpublished data). Human-made vector breeding sites, mainly fish ponds opened for commercial aquaculture, are currently the major driver of residual malaria transmission in urban and periurban areas of Juruá Valley.¹⁹ Malaria transmission occurs year-round and the main local malaria vector is the highly anthropophilic and mostly exophilic *Anopheles darlingi*,²⁰ although *Anopheles albitarsis* s.l. larvae are also abundant in both natural and human-made water bodies in the region.²¹ Long-lasting insecticide-impregnated bed nets are estimated to be available in approximately one-third of households; periodic indoor spraying with residual insecticides is not consistently carried out in the municipality. The annual parasite index in Cruzeiro do Sul in 2016 was 231.9 malaria cases per 1,000 inhabitants (Ministry of Health of Brazil, unpublished data).

Study population and procedures. This prospective observational study was carried out at government-run antenatal care clinics and the only maternity hospital in Juruá Valley, where 96% of all deliveries in the municipality take place,²² all located in the city of Cruzeiro do Sul. Pregnant women attending antenatal clinics or admitted to the maternity ward of the Women and Children's Hospital of Juruá Valley for delivery from July 2015 through June 2016 were eligible for inclusion. At enrollment, pregnant women were interviewed using a structured questionnaire. Data were entered into tablets programed with CSPro software (<https://www.census.gov/programs-surveys/international-programs.html>). Information on selected household assets was combined to derive a wealth index, used as a proxy of socioeconomic status for each participant.²³ The best estimate of gestational age was obtained from ultrasonography, carried out between 12 and 20 weeks of pregnancy and available for approximately one-third of study participants, or the reported date of the last menstrual period, for those without an ultrasound scan or with poor ultrasound images.²⁴ We used a portable SonoSite Titan machine (SonoSite, Bothell, WA) with curvilinear abdominal transducer, which was operated by two study radiologists. The following measurements were considered: crown-rump length (measured before week 14) or the biparietal diameter and femoral diaphysis length (measured between weeks 15 and 20). All images were reviewed by an expert obstetrician not involved in field work; 96.0% of them were scored as appropriate for pregnancy dating using a previously defined quality control protocol.²⁵ In a separate analysis, we found an excellent agreement between gestational age estimates obtained for the same study participants from ultrasonography and the reported date of the last menstrual period, with an average difference of 0.39 weeks (95% confidence interval [CI] = 0.27–0.50 weeks); Bland–Altman analysis revealed that 95% of the differences between these estimates are expected to lie in the interval between –2.3 and 3.1 weeks (B.H.L. and colleagues, manuscript in preparation).

Information regarding history of illnesses and treatments received during the current pregnancy was obtained through interview and review of clinical records. According to the latest guidelines of the Ministry of Health of Brazil, folate supplementation (5 mg/day) should be provided up to week 20 of pregnancy; at that time, oral iron supplementation (60 mg of

iron/day) should be started. Anemia diagnosed in pregnant women is presumed to be associated with iron deficiency and treated with 120–240 mg of iron/day.²⁶ Data on antenatal malaria episodes diagnosed by thick-smear microscopy during pregnancy and up to 2 months after delivery were retrospectively obtained from the Malaria Epidemiological Surveillance and Information System database of the Ministry of Health of Brazil (http://200.214.130.44/sivep_malaria/). From this electronic database, we also recovered information on whether malaria episodes were correctly notified as MiP and treated properly. According to the latest malaria therapy guidelines of the Ministry of Health of Brazil,²⁷ primary *P. vivax* infections diagnosed in pregnant women by microscopy or rapid diagnostic tests are treated with chloroquine (CQ), total dose, 25 mg of base/kg over 3 days, without PQ because of the risk of hemolysis in the fetus.^{16,27} To prevent *P. vivax* relapses, a weekly CQ dose of 300 mg over 12 weeks or until delivery is recommended but rarely prescribed. *Plasmodium falciparum* infections in the first trimester are treated with quinine (3 days) plus clindamycin (5 days), whereas those during the second and third trimesters are treated with a 3-day course of artemether (2–4 mg/kg/day) plus lumefantrine (12–24 mg/kg/day).²⁷ Malaria diagnosed by DNA amplification is not routinely treated, except if further confirmed by microscopy or an antigen-based rapid diagnostic test. At delivery, newborns were measured using an inextensible centimeter measuring tape accurate to the nearest millimeter, weighed on a digital scale accurate to the nearest gram, and examined by the attending clinician or obstetric nurse for any clinical abnormalities. Z-scores for birth weight and length were obtained using the INTERGROWTH-21st reference for gestational age and gender.²⁸ Venous blood samples (10 mL) were obtained from the mothers at the end of pregnancy (live-born delivery, stillbirth, or miscarriage) for complete blood counts and hemoglobin measurement as well as DNA extraction for molecular diagnosis of malaria, irrespective of any clinical symptoms. Umbilical cord blood samples (1 mL) were obtained for molecular diagnosis of congenital malaria.

Molecular diagnosis of malaria. We used a two-step strategy for molecular malaria diagnosis on venous and cord blood collected at delivery. We first screened samples with a genus-specific real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) with a sensitivity of 2–5 parasites/μL of blood, followed by TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) for species-specific diagnosis, both methods targeting the 18S *rRNA* gene of human malaria parasites.²⁹ DNA templates for polymerase chain reaction (PCR) amplification were isolated from 200 μL of whole blood using QIAamp DNA blood kits (Qiagen, Hilden, Germany), with a final DNA elution volume of 200 μL. The 20-μL reaction mixture of RT-PCR contained 5 μL of sample, 7.5 μL of 2 × Maxima SYBR Green quantitative PCR master mixture (Fermentas, Burlington, Canada), distilled water, and 0.1 μM of each oligonucleotide primer (forward, 5'-GTT AAG GGA GTG AAG ACG ATC AGA-3' and reverse, 5'-AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT AA-3')²⁹ to amplify a 157- to 165-base pair fragment. We used a Step One Plus RT-PCR System (Applied Biosystems) for DNA amplification, with a template denaturation step at 95°C for 10 minutes (min), followed by 40 cycles of 15 seconds (sec) at 95°C, and 1 min at 60°C, with fluorescence acquisition at the end of each extension step. Amplification was immediately followed by a melting program consisting of 15 sec at 95°C, 1 min at 60°C,

and 95°C for 15 sec, with fluorescence acquisition at each temperature transition. For TaqMan assay,²⁹ each 20-µL reaction mixture contained 5 µL of sample DNA, 10 µL of TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems), 0.1 µM of each genus-specific unlabeled oligonucleotide primer, 0.08 µM of each species-specific labeled probe (*P. vivax*: 5' VIC [Applied Biosystems proprietary green fluorescent dye]-AGC AAT CTA AGA ATA AAC TCC GAA GAG AAA ATT CT-QSY [Applied Biosystems proprietary quencher] 3'; *P. falciparum*: 5' FAM [6-carboxyfluorescein]-AGC AAT CTA AAA GTC ACC TCG AAA GAT GAC T-QSY [Applied Biosystems proprietary quencher] 3'; *P. malariae*: 5' NED [Applied Biosystems proprietary yellow fluorescent dye]-CTA TCT AAA AGA AAC ACT CAT-MGB [minor groove binder] quencher 3'), and distilled water to complete 20 µL. Polymerase chain reaction amplification comprised an initial step at 50°C for 2 min and template denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. No-template controls (containing all reagents for amplification except for the DNA template) were run for every PCR microplate.

Clinical definitions. An antenatal malarial infection was defined as any episode of parasitemia, irrespective of the parasite density, diagnosed by thick-smear microscopy in study participants before delivery. Malaria is a notifiable disease in Brazil, with both laboratory diagnosis and treatment being available free of charge in government-run malaria outposts.¹⁶ Because malaria treatment is not offered by private clinics and antimalarials cannot be purchased in local drugstores, we assume that virtually all antenatal malaria episodes in study participants were treated in public facilities and notified to the Ministry of Health. A perinatal malarial infection was defined when the parasite's DNA was detected by the research team on a venous blood sample collected at delivery, regardless of any symptoms. Congenital malaria was defined as any parasitemia detected by DNA amplification on a cord blood sample collected at delivery. Miscarriage was defined as a fetal death before 22 weeks of pregnancy; stillbirth was defined as a fetal death at or after 22 weeks of pregnancy. A delivery before 37 weeks of pregnancy was defined as preterm. Low birth weight was defined as a birth weight below 2,500 g, regardless of gestational age. Small-for-gestational-age (SGA) newborns are those whose weight is below the 10th percentile of the INTERGROWTH-21st reference for the gestational age.²⁸ Maternal anemia was defined as a hemoglobin concentration below 11 g/100 mL; hemoglobin levels below 7 g/100 mL characterized severe anemia.

Statistical analysis. Data were entered and cleaned using Stata 14.1 (StataCorp, College Station, TX) and analyzed with Stata 14.1 or SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Proportions were compared by applying standard χ^2 tests to contingency tables and means were compared with standard unpaired Student *t* tests. Statistical significance was defined at the 5% level (two-tailed tests) and 95% CIs were estimated whenever appropriate.

Multiple logistic regression models were run to identify correlates of three outcomes: 1) antenatal malaria diagnosed by conventional microscopy, 2) perinatal malaria diagnosed by nucleic acid amplification, and 3) any MiP diagnosed during pregnancy or at delivery. Covariates included in the logistic models were age in years stratified into three categories (13–20, 21–30, and > 30 years), gravidity (0 = secundigravidae or multigravidae; 1 = primigravidae), years of schooling

stratified into four categories (0, 1–5, 6–10, and > 10 years), wealth index stratified into quintiles in increasing order (first quintile, 20% poorest), area of residence (0 = urban, 1 = rural), and number of antenatal care visits attended (continuous variable). Demographic variables (age and gravidity) and those that were associated with the outcome at a significance level of at least 15% were retained in the final models, which were restricted to women without missing values. Separate models were built for any malaria and for specific malaria parasite species.

Multiple linear regression models were built to estimate the impact of malaria during pregnancy and malaria at delivery on three outcome variables: birth weight and birth length of newborns (described as z-scores for gestational age and gender) and maternal hemoglobin levels (in g/100 mL). This analysis was limited to pregnancies resulting in live-born singleton infants. Because the effects on health outcomes of sociodemographic determinants are often not direct, but mediated by more proximate factors, our modeling strategy considered distinct hierarchical levels of assumed causality.³⁰ Demographic and socioeconomic covariates, the most distal determinants, included age in years stratified into two categories (13–20 and > 20 years), gravidity (0 = secundigravidae or multigravidae; 1 = primigravidae), neonate's gender (0 = female, 1 = male), mother's years of schooling (continuous variable), wealth index (continuous variable), and area of residence (0 = urban, 1 = rural). The more proximate determinants included 1) environmental and behavioral factors such as prenatal smoking and prenatal alcohol use; 2) access to health care such as number of antenatal care visits attended (as a continuous variable), type of delivery (0 = vaginal, 1 = cesarean), and need for transfusion during pregnancy (only for the hemoglobin models); 3) self-reported comorbidities such as diabetes, chronic or gestational hypertension, and antenatal urinary tract infection; and 4) laboratory-confirmed antenatal or perinatal malaria. Unstandardized regression coefficients (*B*) were interpreted to indicate the influence of a given predictor on each outcome, while controlling for all other variables in the same or more distal hierarchical level. Separate regression models were built for each outcome. Demographic variables (age and gravidity) and those that were associated with the outcome at a significance level of at least 15% were retained in the final model, which only included women without missing values. Not unexpectedly, there was a strong association between age and gravidity (both entered into the models as dichotomic variables); young women were much more likely to be primigravidae ($\chi^2 = 238.13$, 1 d. f., $P < 0.0001$). We thus run separate models with either age or gravidity as the only demographic variable to confirm that a possible collinearity between them did not affect our estimates of the impact of malaria on birth outcomes and maternal anemia. Moreover, similar models were run using birth weight in *grams* and birth length in *centimeters*, instead of the respective z-scores for gestational age, as outcome variables. These models were additionally adjusted for gestational age.

Ethical approval. The institutional review board of the School of Public Health, University of São Paulo, approved the study protocol (no. 872.613, 2014). Written informed consent was obtained from all participants. Parents or guardians also gave written informed consent if the participants were minors (aged < 18 years).

RESULTS

Characteristics of study participants. From July 2015 through June 2016, 1,865 pregnant women attending antenatal clinics in the urban area of Cruzeiro do Sul, or admitted to the maternity ward of the Women and Children's Hospital of Juruá Valley for delivery, were invited to participate in this study. Of those, 1,538 women (82.5%) gave informed consent and were interviewed. Most women (63.8%) were enrolled at the maternity ward at the end of pregnancy, whereas 36.2% were enrolled at antenatal clinics. Compared with non-consenting subjects, enrolled women more often resided in urban areas (65.4% versus 58.3%, $P = 0.011$) and delivered live-born infants (97.3% versus 86.0%, $P < 0.001$). There were only 0.8% stillborn infants and 1.9% miscarriages among enrolled women, while 1.0% non-consenting women delivered stillborn infants, and 13.0% had miscarriages. The present analyses are limited to 1,180 study participants (76.7% of those enrolled) who had a blood sample collected at delivery and examined for malaria parasite's DNA (Figure 1). The vast majority (97.9%) of them attended at least one antenatal care visit, consistent with the high coverage (around 83%) of antenatal care previously reported in this municipality³¹; 56.5% attended seven or more visits. A comparison between study participants ($N = 1,180$) and those who were

FIGURE 1. Study flow diagram. Between July 2015 and June 2016, 1,865 pregnant women attending antenatal clinics or admitted for delivery to the maternity ward of the Women and Children's Hospital of Juruá Valley, Cruzeiro do Sul (Brazil), were invited to participate. Reasons for exclusion and the final number of subjects analyzed are indicated.

enrolled but had no blood sample collected at delivery is shown in Supplemental Table 1 (available online).

Malaria in pregnancy and associated risk factors.

Overall, 122 antenatal malaria episodes—29 (23.8%) due to *P. falciparum*, 91 (74.6%) to *P. vivax*, and 2 (1.6%) to both species—were diagnosed by conventional microcopy and treated in 94 (8.0%) study participants. Of these malaria episodes, 36 (29.5%), 40 (32.8%), and 46 (37.7%) occurred in the first, second, and third trimester of pregnancy, respectively. Twenty-eight (29.8%) mothers experiencing antenatal malaria had at least one laboratory-confirmed *P. falciparum* infection. Significantly, 37 (30.3%) antenatal malaria episodes were not correctly notified to the Ministry of Health as occurring in a pregnant woman; 24 (64.9%) of these misreported malarias were diagnosed in the first trimester of pregnancy, when some women might not be aware of their pregnancy status.

We detected malaria parasite's DNA in 89 (7.5%) mothers' peripheral blood samples collected at delivery, with 74 (83.1%) infections due to *P. vivax*, 14 (15.7%) due to *P. falciparum*, and one (1.1%) due to both species. No *P. malariae* infection was diagnosed by microcopy or DNA amplification. Interestingly, all perinatal infections were asymptomatic. Three (3.4%) asymptomatic parasite carriers had had a previous infection (one due to *P. vivax* and two due to *P. falciparum*) diagnosed and treated within two weeks before delivery, consistent with residual, posttreatment parasitemias. Seven (7.9%) women with asymptomatic perinatal infection, including one *P. vivax* carrier with antenatal malaria diagnosed shortly before delivery, later developed laboratory-confirmed clinical malaria within 2 months; all others remained free of symptoms and untreated over the 2-month postpartum follow-up. A total of 148 (12.5%) study participants had one or more MiP episodes, diagnosed either antenatally, at delivery, or both. Living in rural areas, the strongest predictor of MiP in our study population (Table 1), remained significantly associated with malaria after controlling for potential confounders, such as socioeconomic variables (Table 2). Interestingly, primigravidae were at increased risk of *P. falciparum* (but not of *P. vivax*) carriage at delivery, with borderline statistical significance (odds ratio = 4.802; 95% CI = 0.995–23.168; $P = 0.051$). However, multiple logistic regression analysis revealed no significant association between gravidity and risk of antenatal malaria of any type, *vivax* or *falciparum*.

Infant and maternal outcomes. Of the 1,180 study participants, 23 (1.9%) had a miscarriage, 9 (0.8%) had a stillbirth, and 1,148 (97.3%) delivered live-born infants, including 8 (0.7%) twin pairs. Three neonates (0.3%) died during hospitalization because of extreme prematurity; no mother died within 42 days of delivery. Among 1,140 singleton live-born infants analyzed, birth weights ranged between 780 and 5,060 g, with a mean of 3,222 g (standard deviation [SD], 509 g). The mean z-score for birth weight was 0.092 (SD, 1.026), ranging between -2.972 and 3.889 (Figure 2A). The mean z-score for length was 0.058 (SD, 1.083), ranging between -3.258 and 4.000 (Figure 2B; data for 1,132 neonates). Eighty-six (7.5%) live birth deliveries were preterm, 75 (6.6%) neonates had LBW, and 108 (9.5%) were SGA. Hemoglobin concentrations, measured in 1,101 mothers at delivery, ranged between 5.4 and 18.8 g/100 mL, with a mean of 11.1 (SD, 1.4) g/100 mL (Figure 2C). Overall, 442 (40.1%) mothers were anemic, but only 8 (0.7%) had severe anemia at delivery. Although iron and folate supplements are routinely prescribed to pregnant

TABLE 1

Unadjusted OR with respective 95% CI for associations between study participants' characteristics and antenatal or perinatal malaria in Cruzeiro do Sul, Brazil, 2015–2016

Characteristic	No. of subjects	Antenatal malaria (microscopy)		Perinatal malaria (DNA amplification)	
		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Age (years)					
13–20	380	1.000 (reference)	–	1.000 (reference)	–
21–30	539	0.913 (0.579–1.439)	0.695	0.517 (0.325–0.821)	0.005
> 30	259	0.424 (0.212–0.849)	0.015	0.268 (0.128–0.558)	< 0.0001
Gravidity					
Primigravidae	458	0.930 (0.601–1.437)	0.743	1.599 (1.037–2.466)	0.034
Secundi- or multigravidae	722	1.000 (reference)	–	1.000 (reference)	–
Schooling (years)					
0	56	0.232 (0.031–1.719)	0.153	2.136 (0.848–5.377)	0.107
1–5	147	1.449 (0.778–2.698)	0.242	1.873 (0.966–3.633)	0.063
6–10	413	1.255 (0.789–1.996)	0.337	1.856 (1.132–3.042)	0.014
> 10	564	1.000 (reference)	–	1.000 (reference)	–
Wealth index (quintiles)					
1 (poorest)	240	1.000 (reference)	–	1.000 (reference)	–
2	240	0.880 (0.497–1.559)	0.662	0.572 (0.325–1.005)	0.052
3	219	0.557 (0.289–1.072)	0.080	0.357 (0.184–0.694)	0.002
4	246	0.527 (0.277–1.001)	0.050	0.265 (0.131–0.534)	< 0.0001
5 (least poor)	235	0.336 (0.160–0.709)	0.004	0.174 (0.076–0.399)	< 0.0001
Area of residence					
Urban	770	1.000 (reference)	–	1.000 (reference)	–
Rural	408	3.550 (2.293–5.496)	< 0.0001	4.931 (3.083–7.886)	< 0.0001
Number of antenatal care visits	1,175	1.009 (0.934–1.091)	0.816	0.928 (0.858–1.003)	0.061

CI = confidence intervals; OR = odds ratios.

women in Brazil, no attempt was made to evaluate adherence to supplementation among study participants.

Clinical impact of MiP. Microscopically diagnosed antenatal malaria, but not asymptomatic parasitemia at delivery, was a strong independent predictor of birth weight and length among singleton live-born infants (Table 3). Antenatal malaria

was associated with an average reduction in z-scores for weight of 0.36 (95% CI = 0.14–0.57) and in z-scores for length of 0.31 (95% CI = 0.08–0.54). Quite similar impact estimates were derived from models that included either mother's age or gravidity (but not both) as covariates (data not shown). Separate multiple linear models estimated that infants born to

TABLE 2

Adjusted odds ratios and respective 95% CI, obtained by multiple logistic regression analysis, for associations between study participants' characteristics and malaria diagnosed during pregnancy (antenatal malaria) or at delivery (perinatal malaria) in Cruzeiro do Sul, Brazil, 2015–2016

Outcome	Covariate	aOR (95% CI)	P
Antenatal malaria	Schooling (years)		
	0	0.123 (0.016–0.964)	0.046
	1–5	0.835 (0.404–1.727)	0.626
	6–10	0.797 (0.466–1.364)	0.409
	> 10	1.000 (reference)	–
Perinatal malaria	Area of residence (rural vs. urban)	3.402 (2.127–5.441)	< 0.0001
	Age (years)		
	13–20	1.000 (reference)	–
	21–30	0.678 (0.387–1.187)	0.174
	> 30	0.393 (0.162–0.952)	0.039
	Wealth index (quintiles)		
	1 (poorest)	1.000 reference	–
	2	0.748 (0.409–1.370)	0.347
	3	0.512 (0.249–1.052)	0.068
	4	0.425 (0.193–0.937)	0.034
Malaria in pregnancy (ante- or perinatal)	5 (least poor)	0.373 (0.141–0.985)	0.047
	Area of residence (rural vs. urban)	3.942 (2.369–6.557)	< 0.001
	Age (years)		
	13–20	1.000 (reference)	–
	21–30	0.799 (0.507–1.258)	0.333
	> 30	0.470 (0.241–0.916)	0.027
	Wealth index (quintiles)		
	1 (poorest)	1.000 reference	–
	2	0.929 (0.569–1.516)	0.768
	3	0.485 (0.267–0.883)	0.018
	4	0.514 (0.280–0.947)	0.033
	5 (least poor)	0.389 (0.183–0.826)	0.014
	Area of residence (rural vs. urban)	3.575 (2.417–5.288)	< 0.0001

CI = confidence intervals; aOR = adjusted odds ratios. Complete information available for 1,175 subjects. Separate models were built for each outcome: antenatal malaria, perinatal malaria, and malaria in pregnancy (either antenatal, perinatal, or both).

FIGURE 2. Frequency distribution of outcome measures—z-score for birth weight (A) and z-score for birth length (B) of live-born singleton infants, and maternal hemoglobin levels (g/100 mL) at delivery (C)—in Cruzeiro do Sul, Brazil, 2015–2016. Data for pregnancies with at least one antenatal malaria episode diagnosed by microscopy are indicated as black bar segments and those for malaria-free pregnancies with white bar segments. We analyzed 1,140 study subjects for birth weight, 1,132 for birth length (missing information for eight subjects), and 1,101 for hemoglobin concentrations (missing information for 39 subjects).

mothers who experienced one or more episodes of antenatal malaria were, on average, 0.12 g (95% CI = 0.04–0.20 g) lighter and 0.47 cm (95% CI = 0.05–0.88 cm) shorter, after controlling for gestational age and other potential confounders. Of 93 singleton neonates born to mothers experiencing one or more antenatal malarias, 3.2% were preterm, 8.6% had LBW, and 20.4% were SGA. Primigravidity, chronic hypertension (but not transient hypertension of pregnancy), and prenatal smoking were additional factors that negatively affected fetal growth (Table 3). Antenatal malaria (but not perinatal parasite carriage), cesarean delivery, and need for blood transfusion during pregnancy were independent predictors of decreased maternal hemoglobin levels at delivery (Table 3). Mothers with one or

more antenatal malarias had a mean decrease in hemoglobin concentration of 0.33 g/100 mL (95% CI = 0.05–0.62 g/100 mL), after adjusting for potential confounders; 51.6% were anemic, but none had severe anemia.

We next ran a series of multiple linear regression models to explore how the frequency and timing of antenatal malaria episodes, as well as the infecting malaria parasite species diagnosed either ante- or perinatally, affected birth weight (Figure 3), birth length (Figure 4), and maternal hemoglobin levels (Figure 5), while controlling for the potential confounders listed in Table 3. The main findings may be summarized as follows: 1) even a single antenatal vivax malaria episode was significantly associated with reduced fetal growth and maternal hemoglobin, compared with malaria-free pregnancies; 2) repeated antenatal malarias of any type, experienced by 20 women, had a greater negative impact on birth weight (but not on birth length and maternal hemoglobin) than a single antenatal malaria episode; 3) the adverse effect of repeated malarias became more evident when the analysis was limited to *P. vivax* infections, which were associated with greatly reduced birth weight and hemoglobin levels at delivery; 4) third-trimester malaria episodes appeared to be more harmful than first- and second-trimester episodes—in fact, we were unable to detect a significant impact of first- and second-trimester infections on fetal growth or maternal hemoglobin evaluated at delivery; 5) the magnitude of the adverse impact on fetal growth and hemoglobin levels of third-trimester malarias remained similar, and significant, when we restricted the analysis to women experiencing a single antenatal infection in late pregnancy compared with those who remained malaria-free; and 6) although relatively little harm to the neonate and the mother could be associated with perinatal asymptomatic parasite carriage, *P. falciparum* infections at delivery were associated with a significant reduction in z-score for birth length.

Birth outcomes of infants putatively exposed to PQ in utero. Primaquine (0.5 mg of base/kg/day for 7 days) was retrospectively found to have been prescribed for treatment of 59 of 93 (63.4%) antenatal vivax or mixed-species malaria episodes diagnosed in 52 study participants. Five women had PQ prescribed for two episodes and one participant had PQ prescribed for three consecutive episodes. A large proportion (23% or 39.0%) of 59 PQ-treated infections were diagnosed and treated in the first trimester, but 15 (25.4%) and 21 (35.6%) PQ-treated infections were only diagnosed in the second and third trimester, respectively. Compliance with PQ prescription was not assessed in this study. Twenty-nine (49.1%) PQ-treated *P. vivax* infections had been correctly notified as MiP but were treated incorrectly. Interestingly, no adverse effect on birth outcomes was associated with putative exposure to PQ during pregnancy. All pregnant women given PQ prescription ($N = 52$) delivered live-born infants; their average z-scores for birth weight (−0.214 versus −0.089, $P = 0.725$) and birth length (−0.400 versus −0.080, $P = 0.299$) did not differ significantly, when compared with Student *t* tests, from those found in neonates from PQ-unexposed mothers who had at least one vivax malaria episode diagnosed and treated during this study.

Congenital malaria. Cord blood samples from 637 neonates were tested for the parasite's DNA. *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* DNA was found in 4 (0.6%) and 2 (0.3%)

TABLE 3

Impact of antenatal and perinatal malaria with fetal growth and maternal hemoglobin concentration in Cruzeiro do Sul, Brazil, 2015–2016, after controlling for potential confounders by multiple linear regression analysis

Outcome	Model (no. of subjects)	Covariate	B (95% CI)	P
Birth weight (z-score)	1 (n = 1,139)	Antenatal malaria (yes vs. no)	−0.357 (−0.571 to −0.143)	0.001
		Gravidity (primi- vs. multigravidae)	−0.283 (−0.421 to −0.145)	0.001
		Type of delivery (cesarean vs. vaginal)	0.276 (0.155 to 0.397)	0.001
		Chronic hypertension (yes vs. no)	−0.250 (−0.435 to −0.066)	0.008
		Prenatal smoking (yes vs. no)	−0.278 (−0.482 to −0.075)	0.007
	2 (n = 1,139)	Perinatal malaria (yes vs. no)	−0.071 (−0.295 to 0.152)	0.532
		Gravidity (primi- vs. multigravidae)	−0.282 (−0.420 to −0.143)	< 0.001
		Type of delivery (cesarean vs. vaginal)	0.280 (0.158 to 0.402)	< 0.001
		Chronic hypertension (yes vs. no)	−0.245 (−0.430 to −0.059)	0.010
		Prenatal smoking (yes vs. no)	−0.267 (−0.471 to −0.063)	0.011
Birth length (z-score)	1 (n = 1,132)	Antenatal malaria (yes vs. no)	−0.311 (−0.541 to −0.082)	0.008
		Gravidity (primi- vs. multigravidae)	−0.242 (−0.391 to −0.092)	0.002
		Neonate's gender (male vs. female)	−0.179 (−0.305 to −0.052)	0.006
		Chronic hypertension (yes vs. no)	−0.231 (−0.434 to −0.028)	0.026
		Prenatal smoking (yes vs. no)	−0.299 (−0.520 to −0.078)	0.008
	2 (n = 1,132)	Perinatal malaria (yes vs. no)	−0.149 (−0.391 to 0.094)	0.229
		Gravidity (primi- vs. multigravidae)	−0.232 (−0.382 to −0.082)	0.002
		Neonate's gender (male vs. female)	−0.176 (−0.303 to −0.049)	0.007
		Chronic hypertension (yes vs. no)	−0.231 (−0.434 to −0.028)	0.026
		Prenatal smoking (yes vs. no)	−0.288 (−0.510 to −0.067)	0.011
Maternal hemoglobin (g/100 mL)	1 (n = 1,098)	Antenatal malaria (yes vs. no)	−0.335 (−0.624 to −0.047)	0.023
		No. of antenatal care visits attended	0.064 (0.032 to 0.097)	< 0.001
		Neonate's gender (male vs. female)	0.177 (0.018 to 0.336)	0.029
		Type of delivery (cesarean vs. vaginal)	−0.321 (−0.487 to −0.156)	< 0.001
		Pre- or perinatal blood transfusion (yes vs. no)	−3.284 (−4.215 to −2.352)	< 0.001
	2 (n = 1,098)	Perinatal malaria (yes vs. no)	−0.119 (−0.424 to 0.186)	0.443
		No. of antenatal care visits attended	0.063 (0.030 to 0.095)	< 0.001
		Neonate's gender (male vs. female)	0.181 (0.022 to 0.340)	0.026
		Type of delivery (cesarean vs. vaginal)	−0.328 (−0.495 to −0.161)	< 0.001
		Pre- or perinatal blood transfusion (yes vs. no)	−3.190 (−4.127 to −2.254)	< 0.001

CI = confidence intervals. Only significant ($P < 0.05$) associations between covariates other than malaria and birth and maternal outcomes are shown. Separate models were built for each outcome: antenatal malaria (model 1) and perinatal malaria (model 2).

cord blood samples, respectively. These infants were born to mothers found to carry exactly the same parasite species at the time of delivery. Only one of these congenital infections became symptomatic over the next 4 weeks, being confirmed by microscopic analysis of peripheral blood and treated within 20 days after birth.

DISCUSSION

Despite the accelerated progress toward malaria elimination in most of Latin America,^{6,32} an estimated 4.3 million women are at risk of MiP each year in this continent.¹ Here, we show that antenatal malaria remains common in the main malaria hotspot of Brazil, affecting 8.0% of our study participants—comparable with the recent prevalence estimate at 7.9% in Guayaramerín, an endemic setting in Bolivia next to the border with Brazil.⁵ Neither age nor gravidity emerged as a significant predictor of risk for antenatal malaria in our study, after controlling for potential confounders. Of note, nearly one-third of the antenatal malarial infections were not correctly notified as occurring in pregnant women, implying that MiP may be substantially underreported in Brazil. Moreover, we found further evidence that health-care providers often fail to comply with the country's malaria treatment guidelines for pregnant women in Brazil.¹⁷ We retrospectively found that PQ was prescribed for more than half of the antenatal *P. vivax* infections diagnosed during the study, not only in the first trimester (when the pregnancy status might be unknown) but also in infections correctly reported as MiP. This may expose the fetus to severe hemolysis risk. However, we found no

evidence of adverse birth outcomes in neonates putatively exposed in utero to PQ.

The vast majority of maternal malaria infections detected by DNA amplification at delivery remained asymptomatic, undiagnosed, and untreated up to 42 days after delivery. Whether asymptomatic perinatal infections are harmful to the mother and the neonate in this setting remains unclear; we only found a statistically significant association between falciparum (but not vivax) infection at delivery and decreased birth length (Figure 4). Available prevalence estimates of perinatal malaria in Latin America, few of them from population-based surveys, range widely between 3.5% in the city of Manaus, Brazil,¹⁰ and 39.0% in northwestern Colombia.³³ Congenital infection, found in 0.9% of our cord blood samples tested for malarial DNA, has also recently been reported in Guatemala (14.8% of DNA-positive cord blood samples),¹⁰ northwestern Colombia (3.0–13.0%),^{10,34} and Manaus, Brazil (1.0%).¹⁰ Severe and complicated cases of neonatal malaria have been reported in Colombia,^{35,36} suggesting that at least some of these subpatent and asymptomatic perinatal infections, detected by molecular methods, may later progress to a full-blown disease in similar endemic settings.

Infection with *P. vivax*, the dominating species in Latin America, may impair fetal growth and cause anemia in pregnant women.^{5,7–10,37,38} However, currently available evidence came mostly, although not exclusively,³⁸ from studies that detected parasitemias at delivery, rather than throughout the antenatal period. We thus examined the impact of the frequency and timing of *P. vivax* malaria episodes during

FIGURE 3. Impact of number, timing, and species of antenatal and perinatal malaria episodes on birth weight z-score in Cruzeiro do Sul, Brazil, 2015–2016, as determined by multiple linear regression analysis. The unstandardized regression coefficients (*B*) were interpreted to indicate the average change in birth weight z-score attributable to each malaria type, frequency, or timing throughout the pregnancy, compared with no malaria, while controlling for the potential confounders listed in Table 3. Note that each *B* estimate and respective 95% confidence interval and *P* value were derived from a separate model, which included different numbers of study participants (*n*). For example, in the comparison between participants with multiple antenatal malaria episodes (*N* = 20) with those with antenatal malaria (*N* = 1,046), 73 subjects with a single malaria episode were excluded from the analysis.

pregnancy on fetal growth and maternal hemoglobin in a low-endemicity setting. We observed significantly lower birth weights (mean z-score reduction of 0.30) and lengths (mean z-score reduction of 0.41), as well as lower maternal

hemoglobin concentrations (mean reduction of 0.40 g/100 mL), in pregnancies with a single antenatal episode of vivax malaria, compared with malaria-free pregnancies, showing that one vivax malaria may suffice to adversely affect pregnancy

FIGURE 4. Impact of number, timing, and species of antenatal and perinatal malaria episodes on birth length z-score in Cruzeiro do Sul, Brazil, 2015–2016, as determined by multiple linear regression analysis. The unstandardized regression coefficients (*B*) were interpreted to indicate the average change in birth length z-score attributable to each malaria type, frequency, or timing throughout the pregnancy, compared with no malaria, while controlling for the potential confounders listed in Table 3. Note that each *B* estimate and respective *P* value were derived from a separate model, which included different numbers of study participants (*n*), as explained in the legend of Figure 3.

FIGURE 5. Impact of number, timing, and species of antenatal and perinatal malaria episodes on maternal hemoglobin concentration at delivery in Cruzeiro do Sul, Brazil, 2015–2016, as determined by multiple linear regression analysis. The unstandardized regression coefficients (B) were interpreted to indicate the average change in hemoglobin concentration (g/100 mL) attributable to each malaria type, frequency, or timing throughout the pregnancy, compared with no malaria, while controlling for the potential confounders listed in Table 3. Note that each B estimate and respective 95% confidence interval and P value were derived from a separate model, which included different numbers of study participants (n), as explained in the legend of Figure 3.

outcomes. Repeated infections, many of them likely to originate from relapsing *P. vivax* parasites, were associated with poorer outcomes. In fact, the average decrease in birth weight z-score (0.65) and maternal hemoglobin (0.93 g/100 mL) was greater among women with recurring malarias during pregnancy, consistent with a cumulative adverse impact of these repeated antenatal infections.

We failed to observe a significant adverse impact of early antenatal malaria episodes, namely those occurring in the first or second trimester of pregnancy. In this and another recent study,³⁸ only third-trimester *P. vivax* infections appeared to affect fetal growth and maternal hemoglobin levels evaluated at delivery. Another large study has shown an increased proportion of SGA infants born to mothers who had vivax malaria after 20 weeks' pregnancy, compared with those with no MiP.³⁹ By contrast, falciparum malaria before 20 weeks' pregnancy has been clearly shown to affect fetal growth measured by repeated ultrasound scans before delivery^{40,41} and can cause LBW and maternal anemia at delivery in some African settings.⁴¹ Even a single episode of either *P. vivax* or *P. falciparum* malaria diagnosed and successfully treated during the first trimester was found to increase the risk of miscarriage, although not that of LBW, in a large cohort in Thailand.³⁸ As previously suggested,³⁸ these findings are consistent with a relatively efficient growth recovery, over the remaining gestation, by fetuses that survived an early in utero exposure to malaria, provided that antenatal infections are properly diagnosed and treated.

The present study has some limitations. First, women whose pregnancies ended as miscarriage or stillbirth were more likely to be excluded from our study population. This limited our statistical power to analyze the impact of MiP on

miscarriage and stillbirth.^{38,42} Because we analyzed pregnancy outcomes only for live births, a survivorship bias may have affected our analyses of the impact of early-pregnancy infections. Accordingly, one can argue that pregnancies most severely affected by early malaria episodes were more likely to end as miscarriage or stillbirth, being excluded from our analysis. Second, data on antenatal malaria episodes were retrieved retrospectively and no blood samples were available for further confirmatory diagnostic tests. Because routine antenatal malaria screening, although recommended,¹⁶ has not been widely implemented across the Amazon Basin of Brazil,¹⁷ nearly all malarial infections diagnosed and treated during pregnancy had been identified passively, when febrile women sought treatment in malaria outposts. This precludes any analysis of the impact of antenatal episodes of asymptomatic parasitemia on birth outcomes in this population. Third, parasite's DNA detection in the peripheral blood was the only diagnostic technique performed at delivery and its detection threshold (2–5 parasites/ μ L) is relatively low. No placental samples were available for histopathological examination. Molecular methods on peripheral blood samples may be more sensitive for perinatal malaria diagnosis than microscopic diagnosis or antigen detection on peripheral blood or placenta samples,¹⁷ but placental histopathology can additionally help to determine the timing and intensity of infection and its associated inflammatory changes.^{11,12} A careful association between histological changes in the placenta and birth outcomes in vivax malaria might contribute to our understanding on the pathophysiology of MiP caused by a parasite species that does not sequester massively but significantly affects placental functions. Finally, the infrequency of *P. falciparum* precludes further between-species comparisons

of the impact of MiP on pregnancy outcomes in this low-endemicity setting.

In conclusion, our findings further challenge the common notion that vivax malaria during pregnancy, contrary to falciparum malaria, is a relatively benign health condition in low-endemicity countries. Antenatal malaria infections in the third trimester of pregnancy are associated with significant fetal growth impairment and lower maternal hemoglobin levels at delivery. Such adverse outcomes can be observed even in mothers experiencing a single antenatal *P. vivax* infection but become more evident in those with repeated vivax malaria episodes throughout pregnancy. Moreover, compliance with the national guidelines for vivax malaria treatment in pregnancy is poor, leading mothers and their fetuses to be often exposed to PQ. In particular, better ways to prevent *P. vivax* relapses in pregnancy are urgently needed because the currently recommended weekly CQ prophylaxis for recurring infections¹⁵ is rarely prescribed by attending health professionals and very likely to be poorly adhered to by patients. These results call for improved strategies for MiP prevention in areas where intermittent preventive treatment is not feasible.

Received February 14, 2018. Accepted for publication March 28, 2018.

Published online May 7, 2018.

Note: Supplemental table appears at www.ajtmh.org.

Acknowledgments: We thank all study subjects for their enthusiastic participation in this investigation. The following MINA Brazil Working Group members are acknowledged: Alícia Matijasevich (Faculty of Medicine, University of São Paulo, Brazil), Suely G. A. Gimeno (Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, Brazil), and Bruno P. da Silva (Campus da Floresta, Federal University of Acre, Brazil). Pablo S. Fontoura, Laís C. Salla, Jaques Franco de Carvalho Jr., Priscila T. Rodrigues, and Maria José Menezes (University of São Paulo) are acknowledged for their help with statistical analysis, laboratory support, and administrative support, respectively.

Financial support: This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (FAPESP; grant 2016/00270-6 to MAC), the David Rockefeller Center for Latin American Studies (DRCLAS), Harvard University, Cambridge, MA, and the Fundação Maria Cecília Couto Vidigal, Brazil (to M. C. C.), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq; 407255/2013-3 to M. A. C.), and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH), USA (International Centers of Excellence in Malaria Research [ICEMR] program, grant U19 AI089681 to Joseph M. Vinetz). A. P., M. B. M., J. S.-S., and M. C. C. receive or received scholarships from FAPESP. P. A. R. N., R. M. C., M. A. C., M. C. C., and M. U. F. receive or received scholarships from CNPq.

Disclaimer: The funders had no role in study design, data collection and interpretation, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Authors' addresses: Anaclara Pincelli, Rodrigo M. Corder, and Marcelo U. Ferreira, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, E-mails: anaclarapincelli@usp.br, rodrigo.corder@usp.br, and muferrrei@usp.br. Paulo A. R. Neves, Maira B. Malta, Juliana Sampaio-Silva, and Marly A. Cardoso, Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, E-mails: paugustorn@gmail.com, mairamaltanutri@gmail.com, jukisbio@gmail.com, and marlyac@usp.br. Barbara H. Lourenço, Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, and Department of Preventive Medicine, Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, E-mail: barbara.lourenco@unifesp.br. Rodrigo M. de Souza, Multidisciplinary Center, Federal University of Acre,

Campus da Floresta, Cruzeiro do Sul, Brazil, E-mail: rodrigo.souza@ufac.br. Marcia C. Castro, Department of Global Health and Population, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, MA, E-mail: mcastro@hsph.harvard.edu.

REFERENCES

1. Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, ter Kuile FO, 2010. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. *PLoS Med* 7: e1000221.
2. Rogerson SJ, Desai M, Mayor A, Sicuri E, Taylor SM, van Eijk AM, 2018. Burden, pathology, and costs of malaria in pregnancy: new developments for an old problem. *Lancet Infect Dis* 18: e107–e118.
3. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C, 2001. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 64 (Suppl): 28–35.
4. Singh N, Singh MP, Wylie BJ, Hussain M, Kojo YA, Shekhar C, Sabin L, Desai M, Udhayakumar V, Hamer DH, 2012. Malaria prevalence among pregnant women in two districts with differing endemicity in Chhattisgarh, India. *Malar J* 11: 274.
5. Brutus L, Santalla J, Schneider D, Avila JC, Deloron P, 2013. *Plasmodium vivax* malaria during pregnancy, Bolivia. *Emerg Infect Dis* 19: 1605–1611.
6. Yanow SK, Gavina K, Gnidehou S, Maestre A, 2016. Impact of malaria in pregnancy as Latin America approaches elimination. *Trends Parasitol* 32: 416–427.
7. Nosten F, McGready R, Simpson JA, Thwai KL, Balkan S, Cho T, Hkirijsaroen L, Looareesuwan S, White NJ, 1999. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet* 354: 546–549.
8. Luxemburger C, McGready R, Kham A, Morison L, Cho T, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ, Nosten F, 2001. Effects of malaria during pregnancy on infant mortality in an area of low malaria transmission. *Am J Epidemiol* 154: 459–465.
9. Poespoprodjo JR et al., 2008. Adverse pregnancy outcomes in an area where multidrug-resistant *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections are endemic. *Clin Infect Dis* 46: 1374–1381.
10. Bardaji A et al.; PregVax Study Group, 2017. Burden and impact of *Plasmodium vivax* in pregnancy: a multi-centre prospective observational study. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005606.
11. McGready R et al., 2004. The effects of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections on placental histopathology in an area of low malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 70: 398–407.
12. Souza RM, Ataide R, Dombrowski JG, Ippólito V, Aitken EH, Valle SN, Alvarez JM, Epiphânio S, Marinho CRF, 2013. Placental histopathological changes associated with *Plasmodium vivax* infection during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2071.
13. Machado Filho AC, da Costa EP, da Costa EP, Reis IS, Fernandes EAC, Paim BV, Martinez-Espinosa FE, 2014. Effects of vivax malaria acquired before 20 weeks of pregnancy on subsequent changes in fetal growth. *Am J Trop Med Hyg* 90: 371–376.
14. Umbers AJ, Aitken EH, Rogerson SJ, 2001. Malaria in pregnancy: small babies, big problem. *Trends Parasitol* 27: 168–175.
15. WHO, 2015. *Guidelines for the Treatment of Malaria*, 3rd edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf?ua=1&ua=. Accessed: February 14, 2018.
16. Marchesini P, Costa FTM, Marinho CRF, 2014. A decade of malaria during pregnancy in Brazil: what has been done concerning prevention and management. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109: 706–708.
17. Luz TC, Suárez-Mutis MC, Miranda ES, Moritz AF, Freitas LF, Brasil JC, Osorio-de-Castro CG, 2013. Uncomplicated malaria among pregnant women in the Brazilian Amazon: local barriers to prompt and effective case management. *Acta Trop* 125: 137–142.
18. Mayor A, Moro L, Aguilar R, Bardaji A, Cisteró P, Serra-Casas E, Sigaúque B, Alonso PL, Ordi J, Menéndez C, 2012. How hidden can malaria be in pregnant women? Diagnosis by microscopy, placental histology, polymerase chain reaction and detection of histidine-rich protein 2 in plasma. *Clin Infect Dis* 54: 1561–1568.

19. Ferreira MU, Castro MC, 2016. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J* 15: 284.
20. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI, 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors* 3: 72.
21. Reis IC et al., 2015. Contribution of fish farming ponds to the production of immature *Anopheles* spp. in a malaria-endemic Amazonian town. *Malar J* 14: 452.
22. DATASUS, 2018. *Sistema de Informação Sobre Nascidos Vivos, Cruzeiro do Sul, AC [in Portuguese]*. Available at: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=060702>. Accessed February 24, 2018.
23. Filmer D, Pritchett LH, 2001. Estimating wealth effects without expenditure data—or tears: an application to educational enrollments in states of India. *Demography* 38: 115–132.
24. Wylie BJ et al., 2013. Gestational age assessment in malaria pregnancy cohorts: a prospective ultrasound demonstration project in Malawi. *Malar J* 12: 183.
25. Salomon LJ, Bernard JP, Duyme M, Doris B, Mas N, Ville Y, 2006. Feasibility and reproducibility of an image-scoring method for quality control of fetal biometry in the second trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 27: 34–40.
26. Ministry of Health of Brazil, 2012. *Low-Risk Antenatal Care [in Portuguese]*. Brasília, Brazil: Ministry of Health of Brazil. Available at: <http://dab.saude.gov.br/portaldab/biblioteca.php?conteudo=publicacoes/cab32>. Accessed February 24, 2018.
27. Ministry of Health of Brazil, 2010. *Practical Guidelines for Malaria Therapy [in Portuguese]*. Brasília, Brazil: Ministry of Health of Brazil. Available at: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf. Accessed February 24, 2018.
28. Villar J et al.; International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century (INTERGROWTH-21st), 2014. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the newborn cross-sectional study of the INTERGROWTH-21st project. *Lancet* 384: 857–868.
29. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K, 2004. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol* 42: 5636–5643.
30. Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC, Olinto MT, 1997. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *Int J Epidemiol* 26: 224–227.
31. Negreiros do Valle SC, 2011. *Malaria in the Municipality of Cruzeiro do Sul, Brazilian Amazon [in Portuguese]*. Doctoral Thesis, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. Available at: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6136/tde-16042012-164631/pt-br.php>.
32. Carter KH, Singh P, Mujica OJ, Escalada RP, Ade MP, Castellanos LG, Espinal MA, 2015. Malaria in the Americas: trends from 1959 to 2011. *Am J Trop Med Hyg* 92: 302–316.
33. Carmona-Fonseca J, Agudelo OM, Arango EM, 2017. Asymptomatic plasmodial infection in Colombian pregnant women. *Acta Trop* 172: 97–101.
34. Agudelo-García OM, Arango-Flórez EM, Carmona-Fonseca J, 2017. Submicroscopic and asymptomatic congenital infection by *Plasmodium vivax* or *P. falciparum* in Colombia: 37 cases with placental histopathology and cytokine profile in maternal and placental blood. *J Trop Med* 2017: 3680758.
35. Piñeros-Jiménez JG, Arboleda M, Jaramillo JC, Blair S, 2008. Report of five cases of severe neonatal *Plasmodium vivax* malaria in Urabá, Colombia [in Spanish]. *Biomedica* 28: 471–479.
36. Piñeros-Jiménez JG, Álvarez G, Tobón A, Arboleda M, Carrero S, Blair S, 2011. Congenital malaria in Urabá, Colombia. *Malar J* 10: 239.
37. Rodríguez-Morales AJ, Sanchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, Franco-Paredes C, 2006. Short report: pregnancy outcomes associated with *Plasmodium vivax* malaria in north-eastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 74: 755–757.
38. McGready R et al., 2012. Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: a population-based study. *Lancet Infect Dis* 12: 388–396.
39. Moore KA et al., 2017. Influence of the number and timing of malaria episodes during pregnancy on prematurity and small-for-gestational-age in an area of low transmission. *BMC Med* 15: 117.
40. Schmiegelow C et al., 2017. *Plasmodium falciparum* infection early in pregnancy has profound consequences for fetal growth. *J Infect Dis* 216: 1601–1610.
41. Huynh BT, Cottrell G, Cot M, Briand V, 2015. Burden of malaria in early pregnancy: a neglected problem? *Clin Infect Dis* 60: 598–604.
42. Moore KA, Simpson JA, Scoullar MJL, McGready R, Fowkes FJL, 2017. Quantification of the association between malaria in pregnancy and stillbirth: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 5: e1101–e1112.