Crispim Cerutti Junior

**Caracterização epidemiológica da malária autóctone
do Espírito Santo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Boulos.

Co-orientador: Profa. Dra. Rosely dos Santos
Malafronte.

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cerurtti Junior, Crispim

Caracterização epidemiológica da malária autóctone do Espírito Santo / Crispim
Cerutti Junior. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Marcos Boulos.

Co-orientadora: Rosely dos Santos Malafrente.

Descritores: 1.Malária/epidemiologia 2.*Plasmodium falciparum* 3.Métodos
epidemiológicos 4.*Plasmodium vivax* 5.Técnicas e procedimentos de laboratório
6.Brasil

USP/FM/SBD-004/07

**Ao Crispim original, que, com
sua bondade, exemplo e força
moral, fez com que eu chegasse
onde estou hoje. Saudade é uma
palavra insuficiente...**

**A Filomena, que continua
cúmplice incorrigível. Ela é uma
leoa, circulando à minha volta,
alerta aos perigos potenciais e
fazendo com que eu mantenha a
postura ereta diante das
incertezas.**

**À minha pequena grande mãe,
que me deu lições de orgulho,
firmeza e determinação,
ensinando-me que a persistência
e a dedicação podem superar as
barreiras supostamente
insuperáveis.**

**Somos apenas o produto
daqueles que nos amam.**

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcos Boulos, por ter sido, mais do que um Orientador, um Conselheiro, confiando em nosso potencial e respeitando nossos limites. A sua paciência e a sua compreensão foram fundamentais tanto nos momentos em que nos julgávamos invulneráveis, quanto naqueles em que nos achávamos insuficientes.

À Dra. Rosely dos Santos Malafronte, uma amiga de verdade. Ela tornou possível absolutamente tudo neste trabalho, mas, mais do que isto, me acolheu como parceiro de pesquisas, acompanhou com interesse e preocupação as dificuldades surgidas no plano profissional e pessoal ao longo destes últimos cinco anos e deu um novo significado ao conceito de trabalho em equipe.

Ao Dr. Aloísio Falqueto, colega de Universidade, parceiro de trabalho e amigo, pelo seu apoio incondicional e pelas vezes em que assumiu parte das minhas atribuições de modo a permitir, para mim, maior tempo de dedicação a esta pesquisa.

A Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, alegre companheira que me ajudou a abrir as primeiras portas.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr., que há muito tempo vem acompanhando nossa trajetória, minha e de minha esposa, e nos ajudando no possível para que consigamos galgar novos patamares. Foi ele que me ajudou a estabelecer os primeiros contatos durante o desenvolvimento deste estudo.

Aos Profs. Delsio Natal e Maria Anice Mureb Sallum pelo seu carinho, pela sua atenção e pela inestimável colaboração na elaboração deste e de outros trabalhos em desenvolvimento na mesma linha.

Ao Prof. Ipojuca José Oliveira Dias de Almeida, meu chefe de Departamento, por ter possibilitado que eu me dedicasse às atividades desta pesquisa durante o exercício da docência na Instituição. Sua compreensão e a paciência com que suportou minhas limitações de tempo foram fundamentais.

Ao Prof. Dr. Aluizio C. Segurado, meu orientador de mestrado, pela sua confiança e apoio.

A Izilda Curado, minha precursora no estudo da malária de Mata Atlântica, que contribuiu indiretamente na elaboração da metodologia deste trabalho.

A Priscilla Amaro, Fabiana Morandi Jordão, Maíra Natali Nassar e todos os colaboradores do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo que tornaram possível a realização da parte laboratorial do presente estudo.

A Maria do Carmo Hatab, Arnídio Fernandes Coutinho, Carlos Caucho e todos os colaboradores da Secretaria do Estado da Saúde do Espírito Santo, pela sua dedicação e apoio durante as atividades de campo.

Aos servidores municipais de todos os municípios onde foram investigados os casos de malária autóctone por seu apoio fundamental.

A Roseli e Rose, da Secretaria de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, pela sua atenção e carinho constantes.

A todos os amigos que, ao longo destes anos, colaboraram de forma direta e indireta para o bom desempenho de nossos propósitos.

Aos moradores dos municípios de ocorrência de casos de malária autóctone do Espírito Santo, que nos acolheram com hospitalidade, compreenderam a importância do que estava sendo proposto e colaboraram com entusiasmo. A eles todo o nosso carinho.

“Quando se elimina o impossível, o que sobra,
por mais improvável que pareça, deve conter a
verdade”.

Sir Arthur Conan Doyle (que, por sinal, era
médico), nas palavras de seu personagem:
Sherlock Holmes.

Sumário

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações Gerais.....	1
1.2. A Proteína Circunsporozoíta e sua relação com a imunidade antimalárica. As variantes do <i>Plasmodium vivax</i>.....	4
1.3. A Sorologia para detecção de anticorpos desenvolvidos contra antígenos de formas eritrocitárias de <i>Plasmodium</i> e sua aplicabilidade nos estudos de prevalência.....	8
1.4. Competência e capacidade vetoriais.....	11
1.5. Desempenho dos testes de biologia molecular na detecção de parasitas.....	16
1.6. Malária símia e a viabilidade da transmissão do <i>Plasmodium</i> entre hospedeiros símios e humanos.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo Geral.....	33
3.2. Objetivos Específicos.....	33
4. MÉTODOS.....	35
4.1. Características da Área de Estudo.....	35
4.2. Registro de Casos Autóctones de Malária na Área de Estudo.....	37
4.3. Características da População de Estudo.....	37

4.4. Estratégia de Estudo.....	38
4.5. Diagnóstico Etiológico.....	41
4.5.1. Gota Espessa.....	41
4.5.2. Esfregaço Fino.....	41
4.5.3. PCR Multiplex.....	42
4.5.3.1. Extração do DNA Genômico.....	42
4.5.3.2. Reação de Amplificação.....	43
4.5.3.3. Eletroforese.....	45
4.5.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a detecção de anticorpos contra estágios eritrocitários de <i>Plasmodium</i>	46
4.5.4.1. Antígenos.....	46
4.5.4.2. Reação.....	46
4.5.5. ELISA para a Detecção de Anticorpos contra Peptídeos Sintéticos Correspondentes à Porção Repetitiva da Proteína Circunsporozoíta (CSP) de <i>P. vivax</i> e suas variantes, e <i>P. malariae</i>	47
4.5.5.1. Peptídeos Sintéticos.....	47
4.5.5.2. Reação.....	48
4.6. Capturas Aleatórias de Anofelíneos Peridomiciliares e Verificação da sua Infecção por <i>Plasmodium</i>.....	50
4.6.1. Técnica de Captura.....	50
4.6.2. Identificação e Transporte em Longa Distância.....	50
4.6.3. PCR para a detecção de <i>Plasmodium</i> de seres humanos em Anofelíneos.....	51
4.6.3.1. Extração de DNA.....	51

4.6.3.2. Reação de Amplificação (“nested” PCR).....	51
4.6.3.3. Eletroforese.....	53
4.7. Geoprocessamento dos Casos de Malária Autóctone.....	53
4.8. Coleta de Material Biológico em Área Testemunha.....	54
4.9. Pesquisa de <i>Plasmodium</i> em símios da região.....	55
4.10. Análise dos dados.....	56
5. RESULTADOS.....	58
5.1. Pacientes.....	58
5.1.1. Dados Epidemiológicos.....	58
5.1.2. Dados Clínicos.....	68
5.1.3. Dados Laboratoriais.....	70
5.1.3.1. Características Morfológicas.....	70
5.1.3.2. PCR Multiplex para <i>Plasmodium</i> de Humanos.....	79
5.1.3.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a Detecção de Anticorpos contra Estágios Eritrocitários de <i>Plasmodium</i>	79
5.1.3.4. ELISA para a Detecção de Anticorpos contra Peptídeos Sintéticos Correspondentes à Porção Repetitiva da CSP de <i>P. vivax</i> e suas variantes, e <i>P. malariae</i>	80
5.1.4. Geoprocessamento dos Casos de Malária Autóctone.....	84
5.1.5. Correlações e Associações.....	85
5.2. População Exposta.....	85
5.2.1. Características da Amostra.....	85
5.2.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a detecção de Anticorpos contra Estágios Eritrocitários de <i>Plasmodium</i>	88

5.2.3. ELISA para a Detecção de Anticorpos contra Peptídeos Sintéticos Correspondentes à Porção Repetitiva da CSP de <i>P. vivax</i> e suas variantes e <i>P. malariae</i>	99
5.2.4. PCR Multiplex para <i>Plasmodium</i> de Humanos.....	102
5.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a Detecção de Anticorpos contra Estágios Eritrocitários de <i>Plasmodium</i> em Amostras coletadas de Moradores da Área Testemunha.....	103
5.4. Captura Aleatória de Anofelíneos Peridomiciliares e Verificação de sua Infecção por <i>Plasmodium</i>.....	105
5.5. Pesquisa de <i>Plasmodium</i> em símios da região.....	107
6. DISCUSSÃO.....	110
7. CONCLUSÕES.....	146
8. ANEXOS.....	149
9. REFERÊNCIAS.....	171

Resumo

Cerutti Junior C. *Caracterização Epidemiológica da malária autóctone do Espírito Santo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 215 p.

Os diversos aspectos da cadeia de transmissão da malária autóctone são importantes para o estabelecimento de estratégias de intervenção. Entre abril de 2001 e março de 2004, 65 pacientes e 1.777 habitantes foram avaliados em nove municípios da região montanhosa do Espírito Santo. Foram realizados: gota espessa, esfregaço fino, PCR Multiplex, reação de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de anticorpos contra antígenos de estágios eritrocitários de *Plasmodium* e ELISA para detecção de anticorpos contra peptídeos sintetizados a partir da porção repetitiva da proteína circunsporozoíta (CSP) das variantes de *P. vivax* e do *P. malariae*. Foram capturados anofelíneos no peridomicílio, com pesquisa, por PCR Multiplex, de DNA de *Plasmodium*. O mesmo foi pesquisado também em alguns sítios locais. Os pacientes tinham $35,11 \pm 16$ anos, em média. A maioria era do gênero masculino (51 ou 78,5%), 42 (64,6%) residiam em área rural, 23 (35,4%) eram agricultores e oito (12,3%) estudantes. Não houve viagens relevantes. Sessenta e dois (95,4%) nunca haviam tido malária. Vinte e quatro (36,9%) declararam ter entrado na mata. Predominaram a febre, a cefaléia e os calafrios. A febre era episódica em 63 (96,9%), a cada 48 horas em 48 (73,8%) e a cada 24 horas em 15 pacientes (23,1%). O baço foi impalpável em 26 (42,6%). Foi evidenciado o *P. vivax* em 47 de 48 pacientes e o *P. malariae* naquele restante, por características morfológicas e pela PCR Multiplex. Esta foi positiva para *P. vivax* em 45 dos 48, para *P. malariae* em um e negativa em dois. A IFI foi positiva, para *P. malariae*, em seis de sete testados, para IgM, e em todos os sete para IgG. Para o *P. vivax*, entre 50, 47 (94%) foram positivos para IgM e 48 (96%) para IgG. Entre 50 pacientes, pelo ELISA, 25 (50%) tinham anticorpos contra variantes do *P. vivax* ou contra o *P. malariae*. As frequências individuais foram: 22 (44%) para a VK 210, 11 (22%) para a VK 247, 10 (20%) para o *P. vivax-like* e 10 (20%) para o *P. malariae*. Entre 253 amostras dos habitantes testadas na IFI para o *P. malariae*, o resultado foi positivo em 15,8% (40/253) para IgM e em 44,6% (113/253) para IgG. Para o *P. vivax*, em 1.701, foram 6,2% (105/1701) para IgM e 37,7% (641/1.701) para IgG. Foram detectados anticorpos contra a CSP em 615 de 1.702 amostras (36,1%). Foram 433 (25,4%) para a VK210, 258 (15,1%) para *P. malariae*, 108 (6,3%) para a VK 247 e 182 (10,7%) para *P. vivax-like*. A PCR Multiplex, em 1.527 amostras, detectou *P. vivax* em 23, *P. malariae* em 15, *P. falciparum* em nove e *P. falciparum* e *P. malariae* em um. Entre 785 espécimes de anofelíneos, com 10 espécies, foi encontrado DNA de *P. vivax* em um conjunto de exemplares de *A. evansae*. O *P. malariae/brasilianum* foi identificado pela PCR Multiplex em dois de cinco sítios da região, em um também pelo esfregaço fino. Existem dois possíveis cenários para a transmissão. No primeiro, ela seria inter-humana, com vetores *Nyssorhynchus* secundários. Em um segundo, viria do reservatório sítio, por indivíduos adentrando o ambiente florestal.

Descritores: 1.Malária/epidemiologia 2.*Plasmodium falciparum* 3.Métodos epidemiológicos 4.*Plasmodium vivax* 5.Técnicas e procedimentos de laboratório 6.Brasil.

Summary

Cerutti Junior C. *Study of the epidemiologic aspects of the indigenous malaria in Espírito Santo State* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 215 p.

The several aspects of the transmission cycle of the indigenous malaria are important to base on the intervention strategies. From April 2001 to March 2004, 65 patients and 1,777 inhabitants were evaluated in nine Municipalities of the highlands of Espírito Santo State. Laboratory methods included: thick and thin smears, Multiplex PCR, immunofluorescent assay to detect antibodies against crude blood-stages antigens of the *Plasmodium* genus (IFA) and ELISA to detect antibodies against synthetic peptides corresponding to the repetitive region of the Circumsporozoite protein of *P. vivax* variants and *P. malariae*. Anopheline mosquitoes were captured nearby the houses, being screened by Multiplex PCR in the search for *Plasmodium* DNA. The same test was also applied to some local wild monkeys. Patients had 35.11 ± 16 years old in average. Most of them were males (51 or 78.5%), 42 (64,6%) lived in the rural environment, 23 (35.4%) were farmers and eight (12.3%) were students. There was no relevant history of travel. Sixty-two (95.4%) of them had never experienced malaria before. Twenty-four (36.9%) of them informed excursions inside the forest. The predominant symptoms were fever, headache and chills. Fever was periodic in 63 patients (96.9%), recurring each 48 hours in 48 of them (73.8%) and each 24 hours in 15 (23.1%). Spleen was not palpable in 26 patients (42.6%). Morphologic aspects and PCR results disclosed *P. vivax* as the agent involved in 47 of the 48 cases so screened. Multiplex PCR was positive for *P. vivax* in 45 of 48 tested, for *P. malariae* in another one and negative for the two remaining. IFA tested positive for IgM against *P. malariae* in six of seven evaluated samples, and for IgG against the same parasite in all of the seven. For *P. vivax*, the figures were 47 of 50 (94%) for IgM antibodies and 48 of 50 (96%) for IgG antibodies. From fifty patients whose samples were screened by ELISA, 25 (50%) were positive for *P. vivax* variants or *P. malariae*. The results considering each one of the tested peptides were: 22 (44%) for VK 210, 11 (22%) for VK 247, 10 (20%) for *P. vivax-like* e 10 (20%) for *P. malariae*. Among 253 population samples screened in search for *P. malariae* antibodies at IFA, 40 (15.8%) were positive for IgM antibodies and 113 (44,6%) for IgG antibodies. The search for *P. vivax* antibodies by the same technique in 1,701 samples, resulted in 105 (6.2%) positive for IgM antibodies and in 641 positive for IgG antibodies. Anti-CSP antibodies were detected in 615 of 1,702 tested samples (36.1%). Among these 615, the positive results for each one of the tested peptides were: 433 (25,4%) for VK210, 258 (15,1%) for *P. malariae*, 108 (6,3%) for VK 247 e 182 (10,7%) for *P. vivax-like*. Multiplex PCR detected *P. vivax* DNA in 23 out of 1,527 tested samples, as it did for *P. malariae* in 15 of them, for *P. falciparum* in nine of them and both for *P. malariae* and *P. falciparum* in one of them. Among 785 mosquito specimens, representing 10 Anopheline species, *P. vivax* DNA was found in a set of some *A. evansae* specimens. *P. malariae/brasiliense* was identified by Multiplex PCR in two of five wild monkeys screened, in one of them also by thin smear. There are two possible scenarios to explain this transmission cycle. The first one bears malaria as a disease transmitted exclusively among human beings by secondary *Nyssorhynchus* vectors

present nearby the houses. In a second scenario, the malaria is acquired after the simian reservoir when the human beings make excursions inside the forest.

Descriptors: 1.Malaria/epidemiology 2.*Plasmodium falciparum* 3. Epidemiologic methods 4.*Plasmodium vivax* 5.Laboratory procedures and techniques 6.Brazil.

1 Introdução:

1.1 Considerações Gerais:

Responsável por 300 a 500 milhões de novas infecções e 1,5 a 3 milhões de mortes por ano no mundo inteiro ¹, a malária continua exercendo formidável impacto econômico e social nas diversas áreas tropicais do planeta. Nestas áreas, atinge exatamente aqueles países mais pobres, o que a torna parte integrante do círculo vicioso pobreza-doença-pobreza. Apesar dos esforços das autoridades mundiais em saúde no sentido de controlar a doença, ela continua em franca expansão, como consequência das pressões políticas e sociais. Grandes contingentes populacionais se deslocam de áreas não endêmicas para áreas endêmicas, motivados pela busca de minerais preciosos, como ocorreu recentemente no Sudeste da Ásia e no Brasil ^{2, 3}, para trabalhar em novas fronteiras agrícolas ou em outros projetos de desenvolvimento, como no caso da Índia e do Brasil ^{3, 4, 5}, ou fugindo de conflitos, como acontece na África ⁶. Estes movimentos populacionais aumentam as taxas de transmissão da doença nas áreas endêmicas, precipitam o surgimento de epidemias, alteram as condições ecológicas e as características vetoriais e levam, no seu retorno, a doença para áreas anteriormente sob controle ^{2, 3, 4, 5, 6}. Finalmente, isto resulta no aumento dos coeficientes mundiais de incidência e prevalência da malária, bem como na sua disseminação para países onde não mais existia, como no caso do Azerbaijão, Tajiquistão, Iraque, Turquia e Coreia do Sul ^{6, 7, 8}.

No Brasil, a malária persiste praticamente restrita à Região Amazônica. O número de casos declinou entre os anos de 1999 e 2002 ⁹. Assim, em 2002,

registrou-se um total de 349.965 casos, contra 677.474 registrados em 1999 ⁹. Tal declínio sofreu a influência das atividades de controle da doença, sem dúvida, mas outros fatores estiveram seguramente envolvidos, como, mais uma vez, a mobilidade populacional. Com o esgotamento de várias atividades econômicas nas áreas rurais da Região Amazônica, principalmente o garimpo artesanal, a região tornou-se palco de movimentos migratórios do campo para as cidades. Com condições menos favoráveis de transmissão, o número de casos urbanos tende a ser menor do que aquele observado na área rural. Por outro lado, tais movimentos migratórios ensejaram a eclosão de surtos de malária urbana. Com a estabilização das condições de transmissão da doença nas cidades ¹⁰, o número de casos voltou a aumentar, chegando a 597.907 em 2005 ⁹. Na região extra-Amazônica, têm sido registrados surtos de malária cada vez mais freqüentes, decorrentes da introdução da doença por migrantes infectados oriundos das áreas de transmissão ¹¹. Evitar a ocorrência destes surtos é uma prioridade para o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) em virtude do risco de re-introdução da doença em áreas em que ela já foi erradicada. Um outro desafio que se impõe para o Ministério da Saúde na região extra-Amazônica é a “eliminação de casos autóctones esporádicos que ocorrem em áreas focais restritas desta região” ¹¹. Tais casos estão localizados nas margens do lago da reserva hidrelétrica de Itaipu, em áreas cobertas pela Mata Atlântica nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia, e na região Centro-Oeste, nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul ¹¹.

O Estado do Espírito Santo caracteriza-se por duas áreas geográficas bem distintas. Ao norte da calha do Rio Doce, os relevos são mais suaves e as áreas de floresta mais escassas. Nesta região, predominam atividades pecuárias e o cultivo do

café ¹². As propriedades rurais são maiores e, por isso, o efetivo de trabalhadores contratados é mais volumoso. A intensa exploração da área rural culminou com o esgotamento das reservas florestais e o assoreamento dos rios, o que acarretou períodos de seca prolongados com forte impacto sobre o meio-ambiente e as atividades econômicas. Neste cenário, tem-se desenvolvido um fluxo regular de deslocamentos para a região Amazônica, onde os trabalhadores rurais buscam melhores condições de vida e de trabalho. Ao sul do Rio Doce, o relevo é mais acidentado, com uma área montanhosa bastante extensa. Nesta região, as atividades agrícolas são baseadas em pequenas propriedades. O cultivo do café também é abundante, mas compete com os hortifrutigranjeiros e com monoculturas como a banana ¹². A floresta é mais exuberante e as condições climáticas mais favoráveis.

O Espírito Santo registra cerca de 100 casos de malária por ano, dos quais 10 a 30 são autóctones ¹³. Os casos introduzidos concentram-se no norte do estado, enquanto os casos autóctones ocorrem no sul, nos municípios da área montanhosa, onde também é mais exuberante a Mata Atlântica. Os vetores incriminados na transmissão da malária na Região Amazônica [*Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* e *Anopheles (N.) albitarsis*], assim como o *Anopheles (N.) aquasalis*, podem ser encontrados nas áreas próximas à costa e no norte do estado, mas estão ausentes ou são escassos nas áreas montanhosas, exatamente onde ocorrem os casos autóctones (Núcleo de Entomologia da Secretaria do Estado da Saúde do Espírito Santo. Dados não publicados).

Pouco se sabe sobre os fatores envolvidos na cadeia de transmissão da malária autóctone do Espírito Santo. A baixa incidência e a distância geográfica entre os casos documentados deixam incógnito o reservatório dos parasitas, gerando algumas

hipóteses, como a possibilidade da existência de portadores assintomáticos entre os habitantes da região ou a possibilidade da transmissão a partir de símios locais infectados. A falta de estudos sistemáticos da endemia contribui para a ausência de informações a seu respeito. A elaboração de tais estudos, entretanto, não é simples. Deve levar em consideração diversos aspectos relativos à dinâmica da transmissão da malária, tais como a aplicabilidade dos testes sorológicos e sua relação com a especificidade da imunidade (contra esporozoítos ou contra formas circulantes), competência e capacidade vetoriais, o desempenho dos testes de biologia molecular na detecção dos parasitas, e a viabilidade da ocorrência de transmissão entre hospedeiros diferentes, como os símios e os humanos.

1.2 A Proteína Circunsporozoíta e sua relação com a imunidade antimalárica.

As variantes do *Plasmodium vivax*:

O esporozoíto é a forma infectante do *Plasmodium*, inoculada a partir da glândula salivar do vetor em seu repasto hematofágico. Por ser a primeira forma a entrar em contato com o sistema imune do hospedeiro, este atraiu a atenção dos cientistas envolvidos na tentativa de desenvolver vacinas antimaláricas. Seguindo uma trajetória de sucesso na caracterização de parasitas de roedores e primatas, a estrutura da proteína majoritária que recobre a superfície do esporozoíto do *Plasmodium falciparum* foi caracterizada em 1984¹⁴. Por recobrir sua superfície, recebeu o nome genérico de “proteína circunsporozoíta” ou, de forma abreviada, CSP. A CSP do *P. falciparum* é constituída por 412 aminoácidos, com 41 seqüências repetitivas *em tandem* (dispostas de forma contígua) do tetrapeptídeo:

Asn-Ala-Asn-Pro (NANP) ¹⁴. Em quatro destas 41 seqüências, a alanina é substituída pela valina ¹⁴. Logo ficou evidente que esta porção repetitiva da proteína atua como epítopo, sendo responsável pelo desenvolvimento de imunidade específica contra o esporozoíto, e que esta imunidade pode ser induzida pela inoculação de animais de experimentação com peptídeos sintéticos formados a partir da seqüência original: (NANP)₃ e (NANP)₄ ¹⁵. Estudos em área endêmica revelaram que os títulos e a prevalência dos anticorpos contra estes peptídeos sintéticos era proporcional à taxa de inoculação de esporozoítos pelos mosquitos infectados, não guardava relação com a imunidade desenvolvida contra formas circulantes do parasita e era independente da parasitemia determinada nos indivíduos infectados ¹⁶. Além disso, o título destes anticorpos estava diretamente relacionado com o tempo de exposição e, em situações de baixa transmissão, a prevalência de parasitemias patentes era maior entre as pessoas com títulos menores de anticorpos ¹⁶. Estudos longitudinais revelaram que a produção de anticorpos contra a porção repetitiva da CSP ocorre na maioria daqueles que desenvolvem parasitemia patente ^{17, 18}. Estes anticorpos surgem precocemente, são de curta persistência (meia-vida de cerca de 30 dias) e não apresentam elevação substancial dos títulos em vigência de reinfecção, sendo, provavelmente, não protetores ^{17, 18}.

Logo, a CSP do *Plasmodium vivax* foi também caracterizada ¹⁹. Esta proteína é constituída por 373 aminoácidos, contendo uma região central de 19 seqüências repetitivas constituídas pelo nonapeptídeo: Asp-Arg-Ala-Asp/Ala-Gly-Gln-Pro-Ala-Gly (DRAD/AGQPAG) ¹⁹. A imunogenicidade da seqüência repetitiva foi evidenciada quando anticorpos monoclonais, específicos para esporozoítos de *Plasmodium vivax*, reconheceram, em “Enzyme Immunosorbent Assay” (ELISA), os

peptídeos sintéticos contendo 18 aminoácidos, formados a partir de duas seqüências repetitivas (DGQPAGDRA)₂¹⁹. Um aspecto interessante desta proteína é sua homologia com a CSP de *P. cynomolgi* e *P. knowlesi*, dois parasitas cujos hospedeiros são símios¹⁹. Entretanto, a homologia de seqüência com a CSP de outro parasita humano, o *P. falciparum*, é muito baixa¹⁹. Estas evidências sugerem que as seqüências tenham divergido a partir de uma repetição presente em um ancestral comum a parasitas de símios e de humanos, onde mutações pontuais, inserções e/ou deleções teriam se acumulado e se mantido nas várias gerações¹⁹.

Estudos posteriores revelaram que a seqüência desta proteína não estava conservada em todos os isolados de *Plasmodium vivax*. Na Tailândia, esporozoítos obtidos da glândula salivar de mosquitos cujo repasto havia sido realizado no sangue periférico de indivíduos infectados com *P. vivax* não eram reconhecidos pelos anticorpos específicos por meio da técnica de ELISA²⁰. Esta ausência de reatividade ocorreu em 14% dos casos humanos avaliados²⁰. Para determinar a estrutura das proteínas reativas e não reativas, as seqüências dos genes obtidos a partir de esporozoítos extraídos do mosquito número 210, reativos, e do mosquito 247, não reativos, foram determinadas²⁰. Uma proteína variante foi encontrada nos esporozoítos não reativos, os quais foram denominados VK 247 por causa das iniciais de vivax (V), província de Kanchanaburi (K), onde o estudo foi realizado, e por causa do número do mosquito (número 247) utilizado para a extração das formas infectantes²⁰. Esta proteína variante tem 17 seqüências repetitivas de um nonapeptídeo diferente: Ala-Asn-Gly-Ala-Gly/Asp-Asn/Asp-Gln-Pro-Gly (ANGA(G/D)(N/D)QPG)^{20, 21}. Porém, os parasitas que possuem a proteína variante não são uma espécie à parte, o que ficou demonstrado pela homologia de outras

seqüências de aminoácidos fora da região repetitiva e por sondas de Ácido Desoxirribonucléico (DNA) ribossomal ²⁰. Seguindo esta descoberta, uma série de inquéritos evidenciou que a VK 247 não era incomum, que podia ser encontrada em diversas regiões do mundo ^{22, 23, 24, 25}, inclusive no Brasil ^{23, 26, 27}, e que era capaz de infectar um hospedeiro em concomitância à variante clássica ²⁴. No Brasil, de 18 soros reagentes contra a VK 247, 13 reconheceram concomitantemente a CSP de *Plasmodium malariae* ²³. Quando estes 13 soros foram adsorvidos à seqüência repetitiva específica para o *P. malariae* (NAAG), a reatividade para a VK 247 desapareceu ²³. Ficou evidente, portanto, que soros reagentes contra a CSP de *Plasmodium malariae* podiam apresentar reação cruzada contra a CSP da variante VK 247 de *P. vivax*, provavelmente porque, em duas regiões repetitivas consecutivas de *P. malariae* (NAAGNAAG), existe uma seqüência de aminoácidos idêntica àquela observada na região repetitiva da VK 247 (ANGAGNQPG) ²³. Estudos posteriores revelaram que o número de repetições na porção repetitiva da CSP, tanto de *P. vivax* clássico quanto de VK 247, não é constante, variando entre 15 e 21 repetições ^{8, 28, 29}. Estes estudos também revelaram diversas variações menores nos aminoácidos presentes nas seqüências, cuja freqüência depende da origem geográfica do isolado ^{8, 28, 29}.

Qari et al., avaliando a identidade de oito isolados de *P. vivax* de Papua Nova Guiné, observaram que três deles hibridavam com a seqüência gênero específica, mas não com a seqüência para a CSP ³⁰. Em outras palavras, estes isolados não eram nem o *P. vivax* clássico, nem a variante VK 247 ³⁰. O seqüenciamento da CSP revelou 16 cópias da seqüência repetitiva APGANQEGGAA ³⁰. Os parasitas contendo esta seqüência foram denominados “*P. vivax*-like” ³⁰. Os autores

procuraram estabelecer a relação deste novo parasita com espécies já caracterizadas, encontrando total identidade com o *Plasmodium simiovale*, um parasita originalmente identificado em macacos do Sri Lanka (*Macaca sinica*)³⁰. A homologia com *P. vivax* clássico e com a VK 247, entretanto, era de apenas 83%³⁰. Estas evidências levaram os autores a concluir que estavam diante de uma espécie diferente de *Plasmodium*³⁰. Estudos sorológicos evidenciaram a presença de anticorpos contra peptídeos sintéticos confeccionados a partir da sequência repetitiva do “*P. vivax-like*” em 33% de 80 soros de Papua Nova Guiné e em 24% de 156 soros do Brasil³⁰. A soroprevalência foi superior à da VK 247³⁰. Apesar da identidade com o *P. simiovale*, não há possibilidade de comportamento típico de zoonose, uma vez que não há símios do Velho Mundo no Brasil e não há nenhum símio em Papua Nova Guiné³⁰. Provavelmente, este parasita é igualmente adaptado aos dois hospedeiros, podendo circular neles de forma independente³⁰. Análises de amostras colhidas em diferentes partes do mundo demonstraram a disseminação global do *P. vivax-like*, o qual nunca era encontrado isoladamente, mas sempre em concomitância à variante clássica na amostra individual^{30,31}.

1.3 A Sorologia para detecção de anticorpos desenvolvidos contra antígenos de formas eritrocitárias de *Plasmodium* e sua aplicabilidade nos estudos de prevalência:

Enquanto a presença de anticorpos contra a CSP atesta tão-somente a ocorrência de inoculação das formas infectantes pelos mosquitos, os anticorpos contra antígenos de formas eritrocitárias fornecem evidência de que o protozoário

infectou com sucesso o hospedeiro, tendo, após passagem pelo fígado, invadido as hemácias.

Diversas técnicas já foram empregadas no intuito de evidenciar a presença de anticorpos contra as formas eritrocitárias. As reações de precipitação e fixação do complemento carecem de especificidade para espécie ³². Além disso, a positividade da reação de fixação do complemento é de curta duração, persistindo durante uma média de 42 dias após o ataque primário e 125 dias após recaídas ³². A inibição da hemaglutinação apresenta baixa sensibilidade ^{33,34}.

A reação de imunofluorescência indireta (IFI), entretanto, é espécie específica, mais sensível que a inibição da hemaglutinação e é capaz de detectar a presença de anticorpos por longos períodos ^{33, 34, 35, 36, 37, 38}. Com esta técnica, os anticorpos da classe IgG são detectados no sexto dia de doença na malária por *P. vivax* e entre o oitavo e 13º dia de doença na malária por *P. falciparum* ^{35, 36}. Os anticorpos da classe IgM podem ser detectados ainda mais precocemente, a partir do primeiro dia de febre ³⁹. Os anticorpos da classe IgG podem permanecer detectáveis por muitos anos após a infecção, tendo sido evidenciados até oito anos após a infecção por *P. falciparum*, 13 anos após a infecção por *P. malariae* e três anos após a infecção por *P. vivax*, embora os títulos sofram rápido declínio após os três primeiros anos para todas as espécies ³⁷. Embora a curva de detecção dos anticorpos da classe IgM não tenha sido bem caracterizada em seres humanos, estes não parecem persistir além dos dois ou três primeiros meses após a infecção por *P. falciparum* ⁴⁰. De qualquer forma, a presença de anticorpos da classe IgM é considerada uma evidência de transmissão ativa de malária na área sob estudo ⁴¹.

As técnicas de desenvolvimento mais recente, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e radioimunoensaio, têm o mesmo desempenho que a imunofluorescência indireta no que diz respeito ao momento em que os anticorpos são detectados e à sua persistência ^{34, 42}.

Quanto à sensibilidade e à especificidade das diversas técnicas, tanto a imunofluorescência indireta quanto o ELISA apresentam 71% de sensibilidade na detecção de malária por *P. falciparum* em primoinfectados e 100% de sensibilidade após mais de uma infecção ^{43, 44}. Na detecção de infecção pelo *P. vivax*, a sensibilidade é de 40% para o ELISA e 60% para a imunofluorescência indireta em primoinfectados ⁴³. Após mais de uma infecção, a sensibilidade é de 85% e 100% para o ELISA e para a imunofluorescência, respectivamente ⁴³. A especificidade varia de acordo com o limiar de reatividade utilizado na imunofluorescência. Embora Ferreira e Sanchez tenham assinalado especificidades de 95% para o ELISA e 100% para a imunofluorescência indireta, Abramo et al. chamaram a atenção para a possibilidade de reações cruzadas com antígenos presentes na leishmaniose, toxoplasmose e doença de Chagas, no que diz respeito à infecção pelo *P. falciparum* ^{43, 44}. Ao utilizar a IFI, estes autores detectaram especificidades de apenas 52% tomando como limiar de reatividade o título de 1:20, porém o percentual aumentava para 83% com 1:40, 91,5% com 1:80 e 98% com 1:160 ⁴⁴. O aumento do limiar de reatividade, como era de se esperar, levou a queda da sensibilidade, a qual foi de 100% com os títulos de 1:20 e 1:40, 96% com 1:80 e 87% com 1:160 ⁴⁴.

Assim, a reação de imunofluorescência indireta tem sido considerada a técnica de referência na sorologia da malária ⁴³. É largamente utilizada em inquéritos soroepidemiológicos com o objetivo de determinar a abrangência da endemia na

população, com a capacidade adicional de discriminar a presença de transmissão ativa do patógeno quando são pesquisados anticorpos da classe IgM^{41, 45, 46, 47}. Em situações de baixa incidência de casos clínicos da doença, a sorologia tem demonstrado maior número de infectados, sugerindo que nem todas as infecções se manifestam clinicamente^{46, 47}. Desta forma, em inquérito que envolveu um total de 11.051 habitantes no foco de Aldeia dos Índios em São Paulo, percentuais de até 4% de soropositividade foram observados enquanto poucos casos sintomáticos eram notificados⁴⁶. Também na região Amazônica, em quatro tribos indígenas com percentuais de parasitemias patentes variando entre 2,3% e 9,8%, a soroprevalência detectada foi de 56% para o *P. malariae*, 65% para o *P. falciparum* e 76% para o *P. vivax*⁴⁷.

1.4 Competência e capacidade vetoriais:

A intensidade da transmissão da malária parece estar diretamente relacionada à competência e à capacidade da espécie vetora local. Assim, o *Anopheles darlingi* é o principal vetor da malária no Brasil em virtude de diversas características. O *A. darlingi* é extremamente antropofílico e endofílico^{48, 49}, invade os domicílios em ondas durante a noite inteira e continua entrando, muitas vezes, ainda durante a manhã, às vezes até às dez horas⁴⁸. Além do mais, o *A. darlingi* é extremamente competente. Altas taxas de invasão de glândulas salivares por esporozoítos foram observadas nesta espécie em diversos estudos^{50, 51, 52}.

Em virtude destas características, a transmissão da malária em diversos locais da região Amazônica está estreitamente vinculada à presença do *A. darlingi*. Por

vezes, a incidência de casos difere radicalmente entre locais muito próximos, sendo fator determinante a presença ou ausência do vetor ⁴⁹. A alta competência desta espécie permite que a transmissão da doença seja efetiva mesmo em vigência de densidade vetorial baixa, ou seja, poucos mosquitos são necessários para garantir a manutenção da endemia ⁴⁹. O aparecimento do *A. darlingi* nas capturas, entretanto, não é constante ⁴⁹. Uma visita rápida a uma localidade, muitas vezes, é suficiente para surpreendê-los em grande número, ao passo que, em outras ocasiões, pesquisas prolongadas são negativas ⁴⁹. Pequena queda de temperatura é suficiente para tornar as capturas negativas ⁴⁹. Outros fatores que influenciam são a umidade do ar e as condições dos criadouros, o que pode determinar a mudança súbita dos anofelíneos de um local para o outro ⁴⁹. De fato, via de regra, a transmissão da malária é caracterizada por significativa sazonalidade.

O *A. aquasalis* possui características diferentes. Esta espécie procria em coleções de água contendo significativo teor de cloretos ⁴⁹. Assim, só é um vetor importante em áreas próximas ao litoral, a não ser que exista na localidade algum reservatório de água salobra ⁴⁹. Ao contrário do *A. darlingi*, o *A. aquasalis* possui hábitos exofágicos e zoofílicos ⁴⁹. Portanto, para que se torne um vetor de importância, é necessária uma alta densidade, ou seja, só é um transmissor temível quando numeroso ^{48, 49}.

Quanto ao *A. albitarsis*, é hoje reconhecido como um complexo de espécies crípticas ^{53, 54, 55}. Estudos utilizando a metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) identificaram quatro espécies com base em marcadores genéticos ^{53, 54}. A comparação morfológica com espécies anteriormente descritas identificou a espécie A como *A. albitarsis*, a espécie C como *Anopheles marajoara* e a espécie D

como *Anopheles deaneorum* ^{53, 54}. A espécie B permanece sem correlato na sistematização morfológica ^{53, 54}. Observações posteriores permitiram a identificação de uma quinta espécie, denominada espécie E ⁵⁵. Ela foi diferenciada a partir do *A. marajoara* com base na análise do gene para a síntese da enzima citocromo oxidase I mitocondrial ⁵⁵. Esta espécie foi, recentemente, incriminada na transmissão de malária em Roraima ⁵⁶. O *A. marajoara*, por sua vez, foi considerado o principal vetor na região de Macapá, no Amapá ⁵⁷, e o *A. deaneorum* também foi incriminado como vetor ^{50, 51, 52}. Entretanto, outras observações de campo caracterizaram o *A. albitarsis s. l.* como um anofelíneo que raramente penetra nos domicílios e é zoofílico, não sendo, portanto, considerado um transmissor importante da malária humana ⁴⁹. Nestas observações, não se evidenciou coincidência entre a presença de *A. albitarsis s. l.* e a transmissão da malária ⁴⁹. Zonas em que ele proliferava abundantemente eram livres da doença, enquanto, em algumas áreas malarígenas, o *A. albitarsis s. l.* era raro ou ausente ⁴⁹.

O *Anopheles braziliensis* realiza seu repasto em seres humanos, mas parece preferir os animais ⁴⁹. Em regiões nas quais a presença de gado é escassa ou ausente, fêmeas desta espécie foram encontradas, com maior frequência, no intradomicílio, sugerindo que estes animais sejam uma fonte de sangue preferida pelo anofelíneo ⁴⁹. Pode, entretanto, atuar como vetor em áreas de alta endemicidade ⁴⁹.

Outras espécies de anofelíneos também podem atuar como vetores da malária ^{50, 51, 52}. A competência vetorial pode variar de acordo com a espécie do Plasmódio ^{50, 51, 52}. Assim, o *P. falciparum*, além das espécies vetoras principais, pode ser transmitido pelo *Anopheles costai*, pelo *Anopheles deaneorum* e pelo *Anopheles triannulatus* ⁵¹. O *A. costai* havia sido referido pelos autores das observações em

questão como *Anopheles mediopunctatus*, mas sua classificação como espécie foi revista por Sallum et al.⁵⁸. Considerando as diferentes competências, o *A. costai* equipara-se ao *A. darlingi*, seguindo-se, pela ordem, o *A. deaneorum* e o *A. triannulatus*⁵¹. São, entretanto, refratários ao *P. falciparum*, mas suscetíveis ao *P. vivax*, o *A. albitarsis s. l.* e o *Anopheles nuneztovari*^{50, 52}. O *A. deaneorum* e o *A. costai* são suscetíveis a ambas as espécies, equiparando-se o *A. deaneorum*, em competência, ao *A. darlingi* na transmissão do *P. vivax*^{50, 52}. Apesar de também ser capaz de transmitir as duas espécies, o *A. triannulatus* tem competência inferior^{50, 52}). O *Anopheles oswaldoi*, também pode ser infectado pelas duas espécies. O percentual de esporozoítos nas glândulas salivares foi extremamente baixo em alguns estudos^{50, 51, 52}, porém, análises posteriores evidenciaram infecção substancial em espécimes provenientes do Acre⁵⁹. Estas análises, as quais incluíram a verificação de variações no espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossomal, sugeriram, também para o *A. oswaldoi*, a condição de complexo de espécies crípticas⁵⁹.

Além da competência, diferenças no comportamento dos vetores são determinantes para a sua importância na transmissão da doença. Assim, enquanto o *A. darlingi* e o *A. costai* procriam próximos a áreas de florestas, o *A. nuneztovari* não tem preferências e as demais espécies preferem áreas distantes das mesmas^{50, 52}. O *A. nuneztovari* é exofílico e zoofílico⁴⁹. O *A. triannulatus* também é exofílico, mas suga o homem com facilidade⁴⁹. Para esta espécie, a condição de complexo de espécies crípticas também foi sugerida a partir da identificação do *A. halophylus*, tendo por base a análise isoenzimática e padrões de aloenzimas^{60, 61}. O *A. costai*, por sua vez, é sazonal, extremamente ligado à presença de florestas e essencialmente exofílico^{49, 51, 52}. Sua atuação como transmissor da malária, provavelmente, limita-se

à situação de penetração do homem em seu ambiente natural ⁵¹. A sazonalidade também é marcante para o *A. deaneorum* ⁵¹.

Diferentes espécies de anofelíneos podem apresentar diferentes suscetibilidades às variantes de *P. vivax* ⁶². Assim, no México, enquanto o *A. albimanus* é mais suscetível à VK210, o *A. pseudopunctipennis* é mais suscetível à VK247 ⁶².

Na região extra-Amazônica, ao lado dos vetores comuns àquela região, espécies do subgênero *Kerteszia*, notadamente o *A. cruzii* e o *A. bellator*, também são implicadas na transmissão ^{63, 64, 65}. Estes anofelíneos procriam nos verticilos das folhas das bromélias, o que os torna relacionados às áreas de mata Atlântica em diversos estados e justifica sua virtual ausência da Região Amazônica ^{49, 63, 64}. Sua competência vetorial, entretanto, é baixa, tornando necessária uma alta densidade para que a transmissão da doença se efetue ⁶⁵.

Diversos fatores relacionados ao parasita, ao vetor e ao hospedeiro interferem na dinâmica de transmissão da malária e nas suscetibilidades específicas de cada espécie de anofelíneo ⁶⁶. Assim, existem variedades de parasitas que produzem poucos gametócitos ou cujos gametócitos não amadurecem adequadamente no tubo digestivo do vetor; a velocidade de digestão do sangue interfere na formação de oocistos (quanto mais rápida, menos oocistos), e anticorpos e citocinas do hospedeiro podem bloquear a transmissão, com ou sem a participação do complemento ⁶⁶. Além disso, a idade do mosquito, a quantidade de parasitas dentro da matriz peritrófica e a quantidade e, principalmente, a qualidade dos gametócitos ingeridos influenciam a chance de transmissão efetiva ⁶⁶. Citocinas e/ou outros mediadores da inflamação do hospedeiro humano podem reduzir a transmissão por, provavelmente, promover a

fagocitose, efetivada por leucócitos presentes no repasto, de gametas que acabaram de emergir⁶⁶.

1.5 Desempenho dos testes de biologia molecular na detecção de parasitas:

Ao longo da década de 1990, diversas técnicas diagnósticas relacionadas à biologia molecular vieram somar-se ao repertório de métodos disponíveis para evidenciar a infecção pelo *Plasmodium*^{67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74}. Estas técnicas são constituídas, principalmente, pela hibridação de DNA^{67, 73} e pela reação em cadeia da polimerase (PCR)^{68, 69, 70, 71, 72, 73, 74}. São utilizadas para a identificação de alelos do gene responsável pela síntese da proteína circunsporozoíta^{67, 68} ou do gene responsável pela síntese da subunidade ribossomal 18S dos parasitas^{69, 70, 71, 72, 73, 74}. Diversas metodologias têm sido empregadas, como a hibridação utilizando nitrocelulose⁶⁷ ou em placa de microtitulação, a reação da polimerase em cadeia aninhada (Nested-PCR)^{70, 71, 72, 73, 74} e a reação da polimerase em cadeia mediada pela transcriptase reversa (RT-PCR)⁶⁹. Estas técnicas têm a vantagem de utilizarem pouco material biológico para sua realização, podendo ser executadas até mesmo com DNA extraído a partir de lâminas já coradas⁷⁵.

Quando comparado ao ELISA “sanduíche” para captura de antígenos em esporozoítos, o método de “Southern blotting” com sondas de DNA específicas para as seqüências de CSP, utilizado para detectar alelos de VK 210 e VK 247 em amostras de sangue, apresentou especificidade superior a 95%⁶⁷. A concordância entre os dois métodos foi superior a 88% para alelos individuais, mas menor que 72% para infecções mistas, o que pode ser justificado pela maior sensibilidade da

técnica de hibridação, detectando um número 45% maior de infecções mistas do que o ELISA ⁶⁷. Praticamente todos os casos não confirmados como infecções mistas pelo ELISA foram evidenciados como VK 210 ⁶⁷. Desta forma, todos os casos de discordância obedeciam ao mesmo padrão, ou seja, enquanto fenótipos mistos eram evidenciados tanto em sangue quanto nos esporozoítos pela técnica molecular, o ELISA era positivo apenas para a VK 210 ⁶⁷. A presença de uma banda muito fraca no resultado da hibridação sugeria pequena quantidade de parasitas apresentando alelos VK 247, provavelmente o equivalente a menos de 50 esporozoítos, que é o limite de detecção do ELISA ⁶⁷. Como em apenas uma situação o fenótipo identificado em infecção mista foi o da VK 247, é possível que existam fatores biológicos intrínsecos que suprimem a multiplicação dos parasitas com VK 247 na presença daqueles com VK 210 ⁶⁷. Não houve reação cruzada com DNA de mosquitos ou de humanos ⁶⁷.

A reação em cadeia da polimerase para a detecção de DNA da CSP de *P. vivax* foi avaliada com dois métodos de leitura diferentes, a quimioluminescência e a radiometria ⁶⁸. O padrão-ouro utilizado foi a gota espessa ⁶⁸. As sensibilidades foram de 96% e 91% para a quimioluminescência e radiometria, respectivamente, enquanto as especificidades foram de 90% e 96% ⁶⁸. Parte dos falso-positivos pode ter sido resultante de parasitemias subpatentes à gota espessa ⁶⁸. De fato, ao serem analisadas amostras que eram com certeza positivas ou negativas, a especificidade aumentou para 98% com a quimioluminescência e 100% com a radiometria ⁶⁸. Ambos os métodos de leitura foram capazes de detectar menos de 100 parasitas por microlitro em amostras individuais ⁶⁸.

O ácido ribonucleico (RNA) ribossomal, particularmente a subunidade 18S, tem sido proposto como um “alvo” molecular ideal para a identificação de parasitas da malária. A sequência da subunidade 18S é composta por um mosaico de regiões conservadas e variáveis. Este tipo de arranjo permitiu o desenvolvimento de “primers” para a amplificação de sequências conservadas dentro de cada membro do gênero *Plasmodium*. A identificação do fragmento amplificado pela RT-PCR pode ser feita posteriormente por hibridação ou sequenciamento. Neste processo, DNA é amplificado, a partir do RNA ribossomal extraído, por meio de uma RT-PCR⁶⁹. São utilizados os nucleotídeos 841 a 844, com uma região conservada interna que permite identificar a sequência como derivada de *Plasmodium*⁶⁹. O método, por meio de competição com quantidades conhecidas de RNA, permite estimar a quantidade de parasitas presentes na amostra⁶⁹. Como dois tipos de RNA ribossomal (um correspondente aos esporozoítos e outro às formas sanguíneas) são encontrados nos vários estágios dos parasitas, o método permite identificar a fase de desenvolvimento do parasita no mosquito⁶⁹. A utilização experimental deste método em amostras contendo *P. malariae* provenientes da London School of Tropical Medicine and Hygiene permitiu a identificação de sequências diferentes daquelas publicadas, mais consistentes com as de outras espécies de *Plasmodium*⁶⁹. Também foi evidenciada diferença de sequência entre isolados de *Plasmodium ovale*, sugerindo a existência de subespécies⁶⁹.

O desenvolvimento de “primers” a partir de sequências específicas para gênero e espécie, do DNA responsável pela síntese do RNA da subunidade 18S do ribossoma do *Plasmodium*, permitiu a elaboração das metodologias de “nested” e “semi-nested” PCR, onde a reação realizada em duas etapas aumenta a sensibilidade

e a especificidade do diagnóstico^{70, 71, 72, 73, 74, 76, 77}. Considerando todas as espécies, estes testes apresentaram uma sensibilidade variando entre 91,4% e 100% e uma especificidade variando entre 67% e 100%^{74, 76}. Para o *Plasmodium falciparum*, a sensibilidade variou entre 80% e 100% e a especificidade entre 86,7% e 100%⁷⁶, com sensibilidade variando entre 82% e 99,8% e especificidade entre 80% e 100% para o *P. vivax*⁷⁶. Mais uma vez, na maioria dos casos, as baixas especificidades puderam ser atribuídas ao fato de que o limite de detecção da PCR é muito inferior ao do padrão ouro utilizado (gota espessa e esfregaço). Enquanto a microscopia pode detectar cinco parasitas por microlitro, a PCR é capaz de detectar a quantidade mínima de dez fentogramas de DNA por microlitro, o equivalente a 0,004 parasitas por microlitro ou cerca de 20.000 parasitas circulantes^{76, 78}. A técnica proposta por KIMURA et al. apresentou uma banda fraca falso positiva quando, em uma amplificação de 25 ciclos, o DNA de *P. vivax* era combinado ao “primer” específico para *P. ovale*⁷³.

Assim, a PCR é considerada o método mais sensível e específico para detectar parasitas circulantes, entretanto, fatores como o tempo prolongado necessário para a realização do teste, o custo e a falta de infra-estrutura laboratorial adequada em muitos locais impedem sua utilização como método diagnóstico^{78, 79}. Sua aplicação tem permanecido restrita a atividades de pesquisa, controle de qualidade dos laboratórios e monitoramento de sensibilidade *in vivo* aos diversos antimaláricos^{76, 78, 79}. Por outro lado, avanços recentes permitiram o desenvolvimento de uma técnica denominada “PCR em tempo real”^{80, 81}. Esta técnica, ao contrário da “nested” PCR, é realizada em apenas uma etapa, em um sistema fechado, o que reduz seu tempo de execução e o risco de contaminação^{80, 81}. O tempo de execução convencional, de

cerca de oito horas, é reduzido para 45 minutos a duas horas, permitindo a realização de mais testes em menos tempo ^{80, 81}. Isto qualifica a técnica para utilização como método diagnóstico, já sendo disponível um “kit” comercial com este objetivo ⁸¹. Quando comparada ao “nested” PCR como padrão ouro, a “PCR em tempo real” apresentou sensibilidade de 99,5 % a 100% e especificidade de 100%, com limites de detecção de 0,7 parasitas por microlitro para o *P. falciparum*, 4 parasitas por microlitro para o *P. ovale* e 1,5 parasitas por microlitro para o *P. vivax* ^{80, 81}.

1.6 Malária símia e a viabilidade da transmissão do *Plasmodium* entre hospedeiros símios e humanos:

Para estabelecer a relação entre espécies do gênero *Plasmodium* que infectam símios e aqueles que infectam humanos, faz-se necessário considerar aspectos evolucionários e filogenéticos. Entre os símios superiores, o *Plasmodium schwetzi*, o *Plasmodium reichenowi* e o *Plasmodium rodhaini* infectam chimpanzés e gorilas; o *Plasmodium pitheci* e o *Plasmodium silvaticum* infectam orangotangos, e o *Plasmodium hylobati*, o *Plasmodium eylesi*, o *Plasmodium youngi* e o *Plasmodium jefferyi* infectam gibões ^{82, 83}. Entre os monos e sagüis, as espécies encontradas são o *Plasmodium cynomolgi*, o *Plasmodium gonderi*, o *Plasmodium coatney*, o *Plasmodium fragile*, o *Plasmodium fieldi*, o *P. simiovale*, o *Plasmodium inui*, o *Plasmodium knowlesi*, o *Plasmodium brasilianum* e o *Plasmodium simium*, estes dois últimos representantes do Novo Mundo ^{82, 83}. Finalmente, o *Plasmodium lemuris* e o *Plasmodium girardi* causam infecções em lêmures ⁸². Existem diversas semelhanças entre estas espécies e as do gênero *Plasmodium* que infectam os seres

humanos. Assim, o *P. reichenowi* tem características morfológicas semelhantes ao *P. falciparum*, o *P. schwetzi* ao *P. vivax* e o *P. rodhaini* ao *P. malariae* ⁸³. Quanto às espécies do gênero *Plasmodium* que infectam monos e sagüis, são semelhantes ao *P. vivax*: o *P. cynomolgi*, o *P. gonderi*, o *P. simiovale* e o *P. simium*, todos com ciclo assexuado de 48 horas, tendo sido demonstrado potencial de recaída para o *P. cynomolgi* e para o *P. simiovale* ⁸². O *P. coatney* e o *P. fragile* são semelhantes ao *P. falciparum*, inclusive com capacidade de seqüestro ⁸². O *P. fieldi* é semelhante ao *P. ovale*, sendo semelhantes ao *P. malariae*, o *P. inui* e o *P. brasilianum*, ambos com ciclo assexuado de 72 horas ⁸². O *P. knowlesi* não tem correlato entre as espécies que infectam o homem, sendo o único a apresentar ciclo assexuado de 24 horas ⁸². É conhecido por sua virulência, tanto para os símios quanto em infecções experimentais de seres humanos ^{82,83}.

Quanto à capacidade de infectar o homem, tal fato foi evidenciado para o *P. rodhaini*, para o *P. schwetzi*, para o *P. knowlesi*, para o *P. cynomolgi*, para o *P. inui*, para o *P. brasilianum* e para o *P. simium* ^{82,83}. Transmissão natural já ocorreu para o *P. cynomolgi* ⁸⁴, para o *P. knowlesi* ^{83,85} e para o *P. simium* ^{86,87}.

Existem evidências de identidade entre espécies símias e humanas. Assim, o *P. rodhaini* é considerado idêntico ao *P. malariae* ⁸³. O *P. simiovale* tem identidade com a espécie variante *P. vivax-like* que infecta seres humanos ³⁰. O *P. schwetzi*, quando transmitido a seres humanos, apresenta a morfologia de *P. ovale* ⁸³. Da mesma forma, quando o *P. ovale* é transmitido a chimpanzés assume a morfologia de *P. schwetzi* ⁸³. Evidências de identidade também existem entre os *P. brasilianum* e *P. simium* e as espécies próprias de seres humanos, *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente. Estas evidências serão discutidas posteriormente.

Espécies de *Plasmodium* que infectam seres humanos foram transmitidas com sucesso para diversas espécies de símios, o que propiciou o desenvolvimento de um bom modelo experimental para o estudo de vacinas, de eficácia de drogas ou de capacidade vetorial de anofelíneos ^{82, 88, 89, 90, 91, 92, 93}. Os símios superiores podem ser infectados por todas as quatro espécies causadoras de infecção em seres humanos ⁸². As infecções, transmitidas por inoculação de sangue contaminado ou por esporozoítos, são auto limitadas, não excedendo três semanas de duração ⁸². Maior persistência e maiores parasitemias são obtidas se os animais forem esplenectomizados antes ou pouco depois da infecção ⁸². Entretanto, a raridade destes animais e a dificuldade em seu manuseio tornam preferível a utilização de outras espécies de símios como modelos experimentais ⁸².

A maior experiência na utilização de monos do Novo Mundo como modelo experimental de infecções por *Plasmodium* próprio de seres humanos tem sido acumulada com o gênero *Aotus* ⁹². Já foi obtida infecção experimental pelo *P. malariae* ⁸⁸, pelo *P. vivax* ^{89, 90, 91, 92} e pelo *P. falciparum* ^{92, 93}. Melhores resultados são obtidos após esplenectomia dos animais, porém animais intactos também podem apresentar infecções produtivas, sempre auto limitadas ^{88, 93}. A transmissão é feita pela inoculação direta de sangue infectado, pela inoculação de esporozoítos obtidos pela dissecação de glândulas salivares de mosquitos que se alimentaram em animais infectados ou pela exposição a picadas destes mesmos mosquitos ^{89, 90, 91, 93}. Diversas espécies de anofelíneos são utilizadas nestes experimentos, como: *Anopheles freeborni*, *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles dirus* e *Anopheles maculatus* ^{89, 90, 91, 93}. Estes anofelíneos foram capazes, inclusive, de transmitir a infecção do símio para seres humanos voluntários ⁸⁹. Foi observado que, ao ser

utilizado o *P. vivax* como espécie infectante, os períodos pré-patentes foram longos, o que foi atribuído ao processo de adaptação dos parasitas às hemácias de outra espécie animal ⁹⁰. No caso do *P. falciparum*, à medida que as cepas eram reinoculadas sucessivamente em novos símios, parasitemias mais altas passavam a ser obtidas, sugerindo, mais uma vez, a adaptação dessas cepas ao novo hospedeiro ⁹³. Surpreendentemente, este processo adaptativo não era acompanhado por mudanças no perfil genético do parasita ⁹³.

Nas Américas, duas espécies de *Plasmodium* causam infecção natural nos símios, o *P. brasilianum* e o *P. simium*. O *P. brasilianum* acomete diferentes espécies de primatas em diversos países da América Central e do Sul ^{82, 94, 95, 96, 97}. No Brasil, o parasita já foi encontrado na Região Amazônica e nas regiões Sul e Sudeste, onde acompanha as áreas de distribuição de mata Atlântica e é observado principalmente em símios das famílias Cebidae e Atelidae ^{86, 87, 95, 96, 98, 99, 100, 101}. O *P. simium*, por sua vez, tem uma distribuição muito mais restrita, sendo encontrado entre as latitudes 20° e 30° Sul, uma área limitada pelos estados do Espírito Santo, ao norte, e Rio Grande do Sul, ao sul ^{95, 96}. O vetor incriminado, nas áreas de Mata Atlântica, é o *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, que freqüentemente apresenta hábitos acrodendrofilicos ^{86, 87, 95, 96, 99, 100, 101}. Este vetor também é considerado importante para a transmissão de malária humana em diversos locais da região extra-Amazônica ^{63, 64, 65}.

A presença de malária humana em uma área, na região extra-Amazônica, parece ser determinada pelo hábito dos mosquitos e pela proximidade entre as habitações e a floresta ^{86, 87, 99, 100}. O *A. cruzii* tem hábitos alimentares exclusivamente relacionados à copa das árvores em algumas regiões, enquanto em

outras faz o repasto tanto nas copas quanto ao nível do solo^{86, 87, 99, 100}. Assim, os estudos revelaram hábitos exclusivamente acrodendrofílicos no Espírito Santo e em São Paulo, enquanto em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul o mosquito podia ser encontrado indistintamente nas copas e no solo^{99, 100}. Houve maior probabilidade de malária humana onde o *A. cruzii* não era exclusivamente acrodendrofílico^{99, 100}. No Rio Grande do Sul, onde o vetor pode ser encontrado nos dois estratos, os autores justificaram a ausência de malária humana pela distância entre as moradias e as áreas de floresta⁹⁹.

A frequência média de infecção das diversas espécies de símios por uma das duas espécies de *Plasmodium* em diversos inquéritos realizados em todo o território nacional é de 14,3%⁹⁶, mas varia de acordo com a região. Desta forma, enquanto percentuais de cerca de 10% foram observados na região Amazônica^{96, 102}, a frequência observada na região Sudeste foi de 35,6% e, na região Sul, de 18%⁹⁶. As frequências variam de acordo com o estado avaliado e com a espécie de primata considerada. Assim, chama a atenção a ausência de infecções em 180 símios capturados em Minas Gerais e em 28 símios capturados no Rio de Janeiro⁹⁶, enquanto taxas de 71% foram observadas no Rio Grande do Sul e de 10,9% no Espírito Santo^{96, 99}. No Espírito Santo, entretanto, esta frequência foi calculada considerando os símios capturados em duas regiões distintas, uma das quais era desprovida de infecções¹⁰³. Se considerarmos apenas os símios da região com infecção presente, o percentual aumenta para 31,2%¹⁰³.

Nas regiões Sudeste e Sul, apenas duas espécies de símios foram encontradas infectadas, o *Alouatta guariba*, representado por duas subespécies (*A. guariba clamitans* e *A. guariba guariba*), e o *Brachyteles arachnoides*^{96, 98}. A frequência de

infecção, entretanto, é muito maior entre os *Alouatta*, com percentuais de 50,8% de infectados ao serem consideradas todas as regiões de captura, enquanto para o *Brachyteles arachnoides* o percentual correspondente foi de 13,6% ⁹⁶. Entre os *Alouatta* infectados, predominaram os exemplares da subespécie *Alouatta guariba clamitans* ⁹⁶. Considerando os vários estados, para o gênero *Alouatta*, 46% dos exemplares capturados estavam infectados em Santa Catarina, o mesmo sendo observado para 62% dos exemplares em São Paulo e 85% no Espírito Santo ^{95, 100, 101}.

Quanto às duas espécies de *Plasmodium*, a frequência de infecções por *P. brasilianum* foi de cerca de 11% ao ser considerado todo o território nacional, mas de cerca de 14% ao serem consideradas apenas as regiões Sul e Sudeste ⁹⁶. Para o *P. simium*, os percentuais foram de 12% para as regiões Sul e Sudeste, mas apenas 2,5% para todo o território nacional ⁹⁶. Este baixo percentual é decorrente da inexistência de *P. simium* na região Amazônica ⁹⁶. Ao ser avaliada a frequência de primatas infectados pelo *P. simium* nos diversos estados, foram observados percentuais de 9,5% para o Espírito Santo, 29,9% para São Paulo, 15,4% para Santa Catarina e 13,3% para o Rio Grande do Sul ⁹⁵. No Espírito Santo, as infecções pelo *P. brasilianum* foram três vezes mais frequentes que as infecções por *P. simium* ^{96, 103}.

O *Plasmodium brasilianum* é hoje considerado idêntico ao *P. malariae*, que causa doença em seres humanos, com base em homologias na sequência de aminoácidos da CSP ¹⁰⁴, na sequência de nucleotídeos do gene que codifica a subunidade ribossomal 18 S ⁹⁷ e nos polimorfismos do gene que codifica a região correspondente à Proteína de Superfície do Merozoíto 1 (MSP-1) ⁹⁷. A infecção experimental de um ser humano por este parasita foi obtida com sucesso ¹⁰⁵. Da mesma forma, o *P. simium* é idêntico ao subtipo do Velho Mundo do *P. vivax*

quando consideradas homologias nos polimorfismos da região terminal 3' do gene que codifica a subunidade ribossomal 18 S e na Fase de Leitura Aberta 470 (Open Reading Frame 470) (ORF 470) da sequência de nucleotídeos do DNA circular materno do parasita ¹⁰⁶. Este parasita é capaz de infectar o homem em condições naturais de transmissão ^{86, 87}.

Considerando as várias relações entre *Plasmodium* de humanos e de símios, Coatney desenvolveu uma teoria para explicar a evolução das diversas espécies de parasitas ⁸³. O autor considera, como provável local de origem do gênero *Plasmodium*, o Sudeste da Ásia, mais precisamente a Malásia Peninsular, onde foi identificado o maior número de espécies em todo o mundo (um total de 12) ⁸³. Primatas infectados teriam migrado para a África, tendo seu retorno posteriormente impedido por alguma barreira ecológica ⁸³. Os animais sobreviventes, com seus parasitas, teriam dado origem a algumas linhagens evolucionárias no continente africano ⁸³. Desta forma, o *P. cynomolgi* teria dado origem a uma linhagem que incluiria o *P. gonderi*, o *P. schwetzi*, o *P. vivax* e o *P. ovale* ⁸³. A linhagem que daria origem ao complexo *P. reichenowi* – *P. falciparum* teria surgido no próprio continente africano ⁸³. A introdução do *P. malariae/brasilianum* e do *P. vivax/simium* em primatas arborícolas do Novo Mundo teria sido mais recente e teria seguido uma rota inversa, ou seja, estes parasitas teriam sido transmitidos a partir de seres humanos infectados ⁸³. Li et al. argumentam que o *P. vivax/simium* teria penetrado no continente americano em duas ocasiões diferentes e por áreas geográficas distintas ¹⁰⁶. Em uma destas ocasiões, o parasita, ainda contendo as características moleculares do subtipo do Velho Mundo, teria sido horizontalmente transmitido para os primatas arborícolas ¹⁰⁶. Na outra ocasião, ficou restrito aos seres

humanos ¹⁰⁶. Duas oportunidades diferentes de evolução teriam ocorrido, portanto, culminando com o que hoje conhecemos como *P. vivax* e *P. simium* ¹⁰⁶.

Diversas análises filogenéticas foram feitas para o gênero *Plasmodium* ^{107, 108, 109, 110, 111, 112, 113}. Observações preliminares, tendo por base o RNA ribossomal, evidenciaram distâncias entre grupos de espécies ^{107, 108, 109}. Assim, formariam grupos distintos: o *P. vivax* acompanhado por todas as espécies que infectam primatas não-humanos, o *P. ovale* acompanhado pelas espécies que infectam répteis, as espécies que infectam aves, as que infectam roedores, o *P. falciparum* acompanhado pelo *P. reichenowi* e o *P. malariae* ^{107, 108, 109}. Análises cladísticas mais recentes, ainda tendo por base o RNA ribossomal, mais especificamente a seqüência de nucleotídeos do gene que codifica a subunidade 18S, sugerem que a evolução filogenética do gênero *Plasmodium* teria resultado em três ou, talvez, quatro grandes grupos ¹¹⁰. Inicialmente, dois ramos teriam se formado, um dos quais resultou em *Plasmodium* de roedores, *Plasmodium berghei* e *Plasmodium yoelii* ¹¹⁰. O outro ramo teria sofrido três divisões adicionais, originando um ramo exclusivo para o *P. ovale* e outro em que o *P. falciparum* aparece, em uma relação de identidade com o *P. reichenowi*, próximo ao *P. malariae/brasilianum* e a espécies de *Plasmodium* de aves e de répteis ¹¹⁰. A terceira divisão teria originado um ramo englobando todas as outras espécies de *Plasmodium* de primatas, inclusive o *P. vivax/simium* ¹¹⁰. Esta análise corrobora as evidências trazidas por aquelas que utilizaram outros marcadores, como o gene para a síntese da CSP ¹¹¹, o gene do genoma linear mitocondrial para a síntese do citocromo *b* ¹¹² e o gene para a síntese de uma protease ¹¹³, com pequenas diferenças. Entretanto, a partir da análise baseada

no gene para a síntese do citocromo *b*, Escalante et al. contestam a origem asiática do gênero *Plasmodium*, atribuindo ao mesmo uma origem africana ¹¹².

A infecção de espécies diferentes de hospedeiros pelas mesmas espécies de *Plasmodium* ^{86, 87, 104, 105, 106}, a implicação da mesma espécie de vetor na transmissão da infecção em ambas as espécies de hospedeiro em condições naturais ^{86, 87, 99, 101} e no modelo experimental ^{89, 90, 91, 93}, e a transferência eficaz de parasitas de seres humanos para símios ^{82, 88, 90, 91, 92, 93} e vice-e-versa ^{83, 86, 87, 89, 105} sugerem a possibilidade da transmissão de malária em um contexto de zoonose. Em tribos indígenas da Amazônia que adotavam a prática de manter símios como animais de estimação, foram observados altos percentuais de anticorpos contra CSP e contra antígenos de estágios eritrocitários de *P. malariae/brasilianum* ⁴⁷. Muitos dos símios cativos estavam infectados pelo mesmo parasita, o que pode ser uma evidência indireta de seu papel como reservatório da infecção dos seres humanos ⁴⁷. Em um inquérito soroepidemiológico realizado na Guiana Francesa, 82,7% dos símios possuíam anticorpos contra estágios eritrocitários de *P. falciparum* em uma área em que este era o agente etiológico mais freqüente da malária humana ¹¹⁴. Neste mesmo estudo, houve alta freqüência de anticorpos contra CSP de *P. malariae/brasilianum* e de todas as variantes de *P. vivax* tanto em seres humanos quanto em símios ¹¹⁴. Os autores sugerem que os símios podem estar participando da cadeia de transmissão não apenas do *P. malariae/brasilianum*, mas também do *P. vivax* e do *P. falciparum* ¹¹⁴. No Gabão, não foi demonstrada a presença de parasitas à gota espessa em chimpanzés e gorilas mantidos em um Centro de Estudos de Primatas situado em área endêmica de malária humana, embora tanto seres humanos como símios fossem freqüentemente picados pelas mesmas espécies de vetor ¹¹⁵. Alguns símios,

entretanto, desenvolveram anticorpos contra estágios eritrocitários de *P. falciparum*

115.

Os estudos acima fornecem algumas evidências sugestivas do comportamento da malária como uma zoonose. Uma evidência clara, entretanto, foi encontrada recentemente em um inquérito realizado na Malásia ⁸⁵. Em uma divisão territorial daquele país, foi constatado, por meio de PCR, que 58% dos casos de malária humana eram causados pelo *P. knowlesi* ⁸⁵. White, ao comentar estes achados em seu editorial, sugere que a partilha de parasitas da malária entre seres humanos e outras espécies de primatas pode ser mais comum do que se suspeita ¹¹⁶.

No presente estudo, para definir a etiologia e a abrangência da malária autóctone no Espírito Santo, utilizamos como métodos diagnósticos a avaliação morfológica (gota espessa e esfregaço) e a “nested” (multiplex) PCR. Avaliamos a frequência de anticorpos contra as variantes da CSP de *P. vivax* e contra a CSP de *P. malariae*, nos pacientes e na população exposta, por meio do ELISA utilizando peptídeos sintéticos. Um inquérito soroepidemiológico foi realizado na população exposta para estimar a frequência de infecções assintomáticas ou oligossintomáticas utilizando a reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos contra estágios eritrocitários dos parasitas. Tal reação também foi realizada nas amostras de plasma dos pacientes. Capturas isoladas de anofelíneos foram realizadas no peridomicílio dos casos alocados, de modo a verificar se vetores de reconhecida competência e capacidade podiam ser encontrados ali em grande número. Estes procedimentos, além da coleta de dados epidemiológicos, foram aplicados para caracterizar os diversos aspectos da cadeia de transmissão da endemia e, assim, subsidiar as diferentes hipóteses relacionadas ao seu reservatório.

2 Justificativa:

Registrada nos municípios da região montanhosa do Espírito Santo desde 1976, a malária residual de sistema de Mata Atlântica de região extra-Amazônica, conhecida pelas autoridades de saúde locais simplesmente como “malária autóctone” ou “autoctonia”, tem causado preocupação aos órgãos competentes. Esta preocupação tem diversas justificativas. Em primeiro lugar, a ocorrência isolada de casos sem que estejam explícitos os elementos habituais da cadeia de transmissão, como presença de outros indivíduos doentes e de vetores de reconhecida competência e capacidade, traz incertezas relativas a quais procedimentos de manejo e controle seriam mais adequados. Como o Espírito Santo não é considerado um estado com ocorrência endêmica de malária, os casos autóctones secundários a um introdutor são habitualmente tratados e acompanhados, sendo o ambiente de sua ocorrência manejado com medidas de combate aos vetores e busca ativa de casos. No caso da malária que ocorre na região montanhosa, tais medidas não parecem ser revestidas de uma relação custo/benefício favorável, uma vez que não se identificam vetores conhecidos e a busca ativa de casos mostra-se sistematicamente infrutífera. Neste contexto, é anseio das autoridades de saúde do estado conhecer as peculiaridades da cadeia de transmissão, de modo a estabelecer a melhor maneira de intervir.

Uma segunda justificativa para a preocupação do corpo técnico da Secretaria de Estado da Saúde, no Espírito Santo, diz respeito à economia do estado. A malária autóctone incide em municípios de reconhecido potencial turístico, o qual vem sendo desenvolvido progressivamente ao longo dos anos. A ocorrência constante de casos

de uma doença endêmica à qual é tradicionalmente imputado um alto potencial de morbidade e mortalidade, embora este não seja o caso na região, pode comprometer intensamente as atividades turísticas, acarretando reveses econômicos óbvios.

Uma terceira justificativa diz respeito a aspectos relacionados à saúde coletiva. Apesar de, aparentemente, os casos de malária não configurarem o possível risco de surto, a Secretaria de Estado da Saúde deseja saber se este comportamento pode sofrer mudanças. Da mesma forma, teme a possibilidade de que a apresentação clínica dos casos incidentes comece a ser revestida por características de gravidade, com risco potencial de vida. Nestas circunstâncias, mais uma vez, considera necessário estabelecer, com base no conhecimento das peculiaridades da cadeia de transmissão, alguma medida de ordem preventiva.

A preocupação das autoridades de saúde transformou-se em desejo de investigar a endemia ainda quando o controle da mesma era de competência da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), nos idos de 1998. Naquela ocasião, a gerência local da FUNASA solicitou auxílio ao Ministério da Saúde, que, por sua vez, incumbiu a Doutora Mércia Arruda de proceder à investigação. Desafortunadamente, diversos problemas de ordem técnica impediram que a investigação fosse levada a efeito, não tendo a mesma progredido além de sua fase preliminar. Com a descentralização das Ações de Saúde, ao serem transferidas as atividades de Vigilância em Saúde para o âmbito dos estados e municípios, a Secretaria de Estado da Saúde assumiu o interesse manifestado pela FUNASA de promover a investigação dos aspectos epidemiológicos que envolvem a malária autóctone, procurando, desta feita, o auxílio da Universidade Federal do Espírito

Santo. Foi assim que, no ano 2000, começamos entendimentos no sentido de estabelecer um Convênio de Cooperação Técnica.

Diante do exposto, apesar de sua natureza descritiva e de não pretender preencher todas as lacunas existentes no conhecimento a respeito da endemia, este trabalho também pode ser caracterizado como pesquisa aplicada, uma vez que foi concebido no sentido de oferecer subsídios ao planejamento das Ações de Saúde.

Por outro lado, este estudo insere-se em um contexto mais amplo, já que as peculiaridades deste cenário endêmico não são exclusivas do estado, mas ocorrem também em outras áreas do sistema de Mata Atlântica do país. Nestas outras áreas, a endemia também tem sido investigada, somando-se este estudo à contribuição dada pelos demais.

3 Objetivos:

3.1 Objetivo Geral:

Caracterizar os aspectos etiológicos, epidemiológicos e clínicos da malária autóctone no Espírito Santo, visando subsidiar o estabelecimento de estratégias de intervenção para o seu controle.

3.2 Objetivos Específicos:

3.2.1 Caracterizar a etiologia da malária autóctone do Estado do Espírito Santo considerando características morfológicas e moleculares dos parasitas.

3.2.2 Caracterizar os diversos sinais e sintomas da malária autóctone do Espírito Santo.

3.2.3 Estabelecer a distribuição geográfica da malária e as características biológicas, sociais e ocupacionais dos pacientes afetados.

3.2.4 Avaliar a existência e a frequência de anticorpos contra as seqüências repetitivas da proteína circunsporozoíta do *Plasmodium vivax*, com todas as suas variantes, e do *Plasmodium malariae*, tanto nos pacientes quanto na população exposta.

3.2.5 Estimar as espécies de anofelíneos presentes no peridomicílio dos pacientes com malária.

3.2.6 Estimar, em estudo de soroprevalência, o percentual de indivíduos expostos que já foi infectado por *P. vivax* e *P. malariae*.

3.2.7 Avaliar a existência de portadores assintomáticos de parasitas na corrente sangüínea entre os habitantes da região, uma vez que os mesmos podem constituir um reservatório que perpetue a cadeia de transmissão.

3.2.8 Avaliar a existência de símios infectados por parasitas da malária na região.

4 Métodos:

4.1 Características da Área de Estudo:

A malária autóctone do Espírito Santo ocorre na região montanhosa do sul do estado. Durante a realização do presente estudo, foram registrados casos em nove municípios a saber: Santa Tereza, São Roque do Canaã, Santa Maria de Jetibá, Domingos Martins, Santa Leopoldina, Alfredo Chaves, Marechal Floriano, Viana e Vargem Alta. Estes municípios situam-se entre as latitudes 19,6° e 20,6° Sul, e entre as longitudes 40,6° e 41° Oeste, sendo de cerca de 100 km a maior distância entre o local de ocorrência de um caso e a capital, Vitória. A região possui cerca de 215.000 habitantes em uma área de cerca de 5.343 km² (figura 1).

✗ Área testemunha

✕ CEREIAS

Elipse: Área de ocorrência de casos

Figura 1 – Municípios do Espírito Santo em que foram registrados casos de malária autóctone ao longo do período do estudo

O relevo é acidentado, com vales estreitos cercados por montanhas. A altitude média é de cerca de 800 metros. O clima é tropical, com temperatura média mais baixa no inverno (cerca de 15° C). Existem bolsões preservados de Mata Atlântica nestes municípios, geralmente nas encostas dos morros, próximos às habitações humanas (figura 2). A fauna silvestre local é constituída por pássaros, répteis e pequenos mamíferos, inclusive símios das famílias Cebidae e Atelidae. Os moradores são, em sua maioria, descendentes de italianos e alemães que migraram para o Espírito Santo no século XIX.

Figura 2 – Relação entre a habitação humana e a presença de floresta em local de ocorrência de caso de malária autóctone

4.2 Registro de Casos Autóctones de Malária na Área de Estudo :

A área em questão era considerada indene até ser registrado um caso, no município de Santa Leopoldina, em 1976. Desde então, os registros têm sido constantes, variando a frequência anual entre 1 e 31 casos. Uma série compreendendo o período de 1985 a 2000 encontra-se na tabela 1.

4.3 Características da População de Estudo:

De acordo com dados censitários fornecidos pela Secretaria de Estado da Saúde, a população residente nos municípios de ocorrência dos casos de malária é jovem, sendo a faixa etária de maior frequência a compreendida entre os 20 e os 29 anos de idade. Há equilíbrio na distribuição dos dois gêneros para todos os municípios

considerados. Quanto à distribuição entre área urbana e área rural, a mesma é variável, oscilando entre o equilíbrio, com 50% a 60% de população rural para Santa Tereza, São Roque do Canaã, Marechal Floriano e Alfredo Chaves, e o predomínio da população rural (cerca de 70% a 80%) para Domingos Martins, Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina e Vargem Alta. A exceção é o município de Viana, que tem parte de sua área geográfica na região montanhosa e parte na planície. Este município faz parte da área metropolitana de Vitória, é o mais populoso entre aqueles em que são registrados casos de malária autóctone e tem predomínio da população urbana, a qual perfaz 93% do total. No entanto, este é um município em que a ocorrência de casos da doença é muito esporádica, tendo sido registrado apenas um ao longo de todo o período deste estudo.

Os municípios mais populosos, com exceção de Viana, são também aqueles de maior frequência de casos. Assim, Domingos Martins tem 30.559 habitantes, Santa Maria de Jetibá tem 28.774 e Santa Tereza tem 20.622. Predominam, em todos os municípios, habitantes com mais de dez anos de idade (cerca de 80% do total), com índice de alfabetização de 87% em média.

4.4 Estratégia de Estudo:

Qualquer caso de malária diagnosticado pelo Laboratório Central da Secretaria de Estado da Saúde, que fosse supostamente autóctone, era imediatamente comunicado ao investigador. A Secretaria de Estado da Saúde disponibilizava, então, um veículo para deslocar o investigador até o paciente. Uma vez em contato com o paciente, o investigador, após esclarecimento dos objetivos do estudo e

assinatura do termo de consentimento pós-informação (anexo 1), aplicava um questionário padrão que consistia de informações como: nome do paciente, iniciais, número de inclusão no estudo, idade, estado civil, profissão, atividades (profissionais ou de lazer) realizadas nos últimos 30 dias, naturalidade, zona de domicílio (rural ou urbana), locais para onde o paciente se deslocava, tempo de sintomas, manifestações clínicas, padrão de ocorrência da febre (periódica ou não), endereço e telefone do paciente (anexo 2). Durante este mesmo contato, era colhida amostra de cinco mililitros de sangue em tubo estéril, a vácuo (Vacutainer BD®), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A coleta era feita com a utilização de material descartável e obedecendo as normas de precaução padrão e biossegurança. Após a coleta, o paciente recebia tratamento específico supervisionado pela equipe técnica da Secretaria de Saúde do município em questão. Caso fosse menor de idade, o consentimento era fornecido pelo guardião legal.

A partir do 14º paciente incluído, após os procedimentos de inclusão, o investigador, acompanhado de equipe constituída por técnicos da Secretaria do Estado da Saúde e da Secretaria Municipal de Saúde, deslocava-se até o local de moradia do paciente para coleta de amostras da população exposta. Os moradores em um raio máximo de dois quilômetros tendo como centro o local de moradia do paciente eram, após cadastro, esclarecimento e assinatura de termo de consentimento pós-informação (anexo 3), também submetidos a coleta de sangue de acordo com a mesma técnica utilizada para o paciente.

Uma segunda visita à área era feita pela equipe de entomologia da Secretaria de Estado da Saúde, a qual procedia a capturas aleatórias de anofelíneos no extra e intra-domicílio.

Tabela 1 - Registro de casos de malária autóctone no Espírito Santo conforme o ano e o município de ocorrência - 1985 a 2000

Municípios	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Alfredo Chaves	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	2	-	-	1
Domingos Martins	1	1	-	-	-	-	-	-	4	4	3	7	3	4	6	2
Fundão	1	1	1	-	4	2	-	4	-	-	-	1	-	1	-	-
Ibiraçu	1	3	1	2	2	1	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-
Itarana	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	4	1	-	-	2
João Neiva	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1	-	1	-	-	-
Marechal Floriano Sta.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	3	1	-	-
Leopoldina	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	1	3	-	4
Sta. Mª Jetibá	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	2	-	1	-	-
Sta. Tereza	-	-	-	-	-	-	-	-	6	4	2	10	4	4	11	3
São Roque do Canaã	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vargem Alta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
Venda Nova do Imigrante	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Viana	1	2	4	6	4	5	-	4	3	-	3	2	2	1	-	-
Total	6	7	6	8	10	8	1	8	17	16	13	31	18	17	19	12

FONTE: Secretaria do Estado da Saúde do Espírito Santo

4.5 Diagnóstico Etiológico:

Os seguintes métodos foram utilizados para o diagnóstico de malária e para a identificação da espécie de *Plasmodium* envolvida: gota espessa ¹¹⁷, esfregaço fino ¹¹⁷, PCR multiplex ⁷⁴, reação de imunofluorescência indireta (IFI) para a detecção de anticorpos contra estágios eritrocitários dos parasitas ^{118, 119} e ELISA para a detecção de anticorpos contra peptídeos sintéticos correspondentes à porção repetitiva da proteína circunsporozoíta (CSP) de *P. vivax*, com suas variantes, e *P. malariae* (^{118, 119}).

4.5.1 Gota Espessa:

Para confecção da gota espessa, gotas de sangue do paciente e dos moradores das diversas regiões eram depositadas em lâminas de vidro e espalhadas no formato de quadrado (dois por lâmina). Após secagem do sangue, as lâminas eram imersas, por um segundo, em azul de metileno para desemoglobinização. A seguir, as lâminas eram cobertas com solução de Giemsa a 2% em tampão fosfato durante dez minutos. Finalmente, as lâminas eram lavadas com tampão fosfato e, após estarem secas, lidas em microscópio óptico com objetiva de imersão.

4.5.2 Esfregaço Fino:

Para confecção dos esfregaços finos, gotas menores de sangue eram depositadas na extremidade de lâminas de vidro. Imediatamente, outra lâmina era

justaposta à primeira, em um ângulo de aproximadamente 45°, abrangendo o sangue em seu vértice. A segunda lâmina era, então, deslizada sobre a primeira, de forma a produzir uma fina camada de sangue em seu trajeto. Tais lâminas eram fixadas com metanol durante 5 minutos e, então, coradas com Giemsa a 5% em tampão fosfato durante 20 a 30 minutos. As lâminas eram, finalmente, lavadas com tampão fosfato e lidas em microscópio óptico com objetiva de imersão.

4.5.3 PCR Multiplex:

4.5.3.1 Extração do DNA Genômico:

O DNA era extraído de alíquotas de 300 µl de concentrado de hemácias obtidas dos pacientes e dos moradores das diversas regiões. As amostras de sangue total com EDTA eram centrifugadas, a 200 g, na Unidade de Medicina Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, sendo separadas alíquotas de plasma e concentrado de hemácias a partir de cada uma. Tais alíquotas, acondicionadas em tubos do tipo Eppendorf, eram enviadas para o laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em invólucro térmico contendo gelo seco, por via aérea, para processamento adicional.

Para a extração de DNA, era utilizado o “kit” “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega-A-1125), segundo o protocolo do fabricante (anexo 4). Para a ruptura das hemácias, não era utilizado o tampão de lise fornecido pelo “kit”, mas sim 1 µl de saponina a 5% adicionada aos 300 µl de concentrado de hemácias. Após incubação a 37°C por 5 minutos, as hemácias eram lavadas com “Phosphate

Buffered Saline” (PBS) pH 7,4 até o sobrenadante tornar-se límpido. O restante do procedimento era realizado conforme o protocolo original do “kit” de extração.

Após cumpridas as etapas de extração, as amostras de DNA eram ressuspensas em 100 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1mM pH 8 (T.E.) e armazenadas a 4°C até a realização da técnica de PCR.

Amostras de sangue humano não parasitado eram utilizadas como “testemunho” negativo para as extrações e para as técnicas de PCR.

4.5.3.2 Reação de Amplificação:

A amplificação era feita em duas etapas sequenciais, segundo o protocolo de Rubio et al. ⁷⁴. Os seguintes “primers”, sintetizados pela Invitrogen Life Technologies do Brasil e pela Applied do Brasil, eram utilizados:

Universal (reverso): **UNR** – 5’ GACGGTATCTGATCGTCTTC 3’.

Plasmódios: **PLF** – 5’ AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC 3’.

Mamíferos: **HUF** – 5’ GAGCCGCCTGGATACCGC 3’.

“Primers” para espécies de Plasmódios (reversos):

P. falciparum: **FAR** – 5’ AGTTCCCCTAGAATAGTTACA 3’.

P. malariae: **MAR** – 5’ GCCCTCCAATTGCCTTCTG 3’.

P. vivax: **VIR** – 5’ AGGACTTCCAAGCCGAAGC 3’.

A primeira etapa incluía os “primers” UNR, HUF e PLF, para amplificação da região 18S do RNA do gênero *Plasmodium*.

A segunda etapa identificava a espécie de *Plasmodium*. O produto da primeira etapa era diluído quinhentas vezes em água estéril e submetido aos “primers” MAR,

FAR e VIR. Um fragmento de 269 pares de bases (pb) produzido a partir de PLF e MAR indicava uma infecção por *P. malariae*, um fragmento de 395 pb a partir de PLF e FAR indicava uma infecção por *P. falciparum* e um fragmento de 499 pb a partir de PLF e VIR indicava uma infecção por *P. vivax*. Infecções mistas, se presentes, deveriam ser evidenciadas pela presença simultânea dos fragmentos correspondentes às espécies envolvidas.

Antes de ser feita a mistura para a reação de PCR, a concentração final de todos os “primers” era ajustada para 10 pmoles/ μ l. Fragmentos correspondentes ao gênero *Plasmodium* eram amplificados em um volume final de 25 μ l contendo: 2,5 μ l de tampão de Taq DNA polimerase 10x (Invitrogen), 0,25 μ l de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) mix (10 mM), 1,25 μ l de UNR e PLF, 0,1 μ l de HUF, 0,25 μ l de Platinum Taq DNA polimerase (5 U/ μ l) (Invitrogen) e 5 μ l de DNA genômico, sendo o volume final ajustado com água estéril.

Na segunda etapa, eram utilizados 2,5 μ l de tampão de Taq DNA polimerase 10x (Invitrogen), 0,25 μ l de dNTP mix (10 mM), 1,25 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 1,25 μ l de PLF, 0,75 μ l de FAR, 0,156 μ l de MAR, 0,125 μ l de VIR e 2 μ l do produto da primeira etapa diluído, totalizando um volume final de 25 μ l.

Como controle positivo, era utilizado DNA de *Plasmodium* obtido a partir de gotas espessas realizadas em pacientes com malária.

O termo-ciclador utilizado era da marca Eppendorff Mastercycle.

Protocolo do termo-ciclador para as várias amplificações:

Primeira etapa:

94° C por cinco minutos (desnaturação).

40 ciclos a:

94° C por 45 segundos.

62° C por 45 segundos.

72° C por 60 segundos.

Segunda etapa:

94° C por cinco minutos (desnaturação).

35 ciclos a:

94° C por 20 segundos.

62° C por 20 segundos.

72° C por 30 segundos.

72° C por 10 minutos (extensão).

Por fim, o produto da amplificação era mantido a 4° C até ser submetido à eletroforese.

4.5.3.3 Eletroforese:

Após amplificação, as amostras eram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, imerso em tampão Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 1x. Como padrão de Peso Molecular, utilizávamos 10 µl de 100 pb Ladder (1 µg/µl) (Invitrogen). O gel era corado com brometo de Etídio (0,5 µg/ml). Os produtos eram visualizados e fotografados no Sistema Labworks (UVP).

4.5.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a detecção de anticorpos contra estágios eritrocitários de *Plasmodium*:

4.5.4.1 Antígenos:

Eram utilizados antígenos de formas assexuadas de *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum* obtidos respectivamente de pacientes primoinfectados e de cultura do parasita.

As lâminas utilizadas foram cedidas pelo Laboratório de Malária do Instituto Evandro Chagas de Belém do Pará (*P. vivax* e *P. malariae*), pelo Dr. William E. Collins (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EUA) (*P. malariae*) e pelo próprio Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (*P. vivax* e *P. falciparum*). Os antígenos eram constituídos por uma suspensão de hemácias lavadas em PBS pH 7.2, com parasitemia ideal e predominância de trofozoítos maduros e esquizontes. Eram adicionados 10 µl desta suspensão sobre as áreas demarcadas de lâminas de vidro para imunofluorescência. Após secarem a temperatura ambiente, as lâminas eram embrulhadas e armazenadas à -20°C, até o momento do uso.

4.5.4.2 Reação:

A reação para detecção de anticorpos das classes IgG e IgM contra formas sanguíneas de *P. vivax* e *P. malariae* seguia a padronização proposta por Curado et al.^{118, 119}. Os limiares de reatividade eram determinados considerando os títulos de 40

soros do Banco de Sangue, como controles negativos, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

As amostras de plasma eram diluídas em PBS pH 7,2 contendo 1% de Tween 80, à razão 2, a partir de 1:40. Uma alíquota de 10 µl de cada diluição do plasma era depositada em cada orifício da lâmina com o antígeno. Seguia-se incubação em câmara úmida por 30 minutos à 37°C. Após a primeira incubação, as lâminas eram lavadas duas vezes com PBS 7,2, por dez minutos cada, e posteriormente secas. Em seguida, cada orifício era recoberto com soro anti-IgG ou anti-IgM conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluído em solução de azul de Evans, e as lâminas eram incubadas em câmara úmida à 37°C durante 30 minutos. As mesmas eram novamente lavadas duas vezes em PBS 7,2 por 10 minutos, para remoção do excesso de conjugado, secas e montadas com *anti-fade* (solução glicerina pH 8).

Eram incluídos controles positivos e negativos em cada ensaio. Os resultados eram expressos em títulos, correspondendo à recíproca da última diluição do plasma com reação positiva.

4.5.5 ELISA para a Detecção de Anticorpos contra Peptídeos Sintéticos Correspondentes à Porção Repetitiva da Proteína Circunsporozoíta (CSP) de *P. vivax* e suas variantes, e *P. malariae*:

4.5.5.1 Peptídeos Sintéticos:

Os peptídeos utilizados para detecção de anticorpos da classe IgG contra a região repetitiva específica da proteína circunsporozoíta eram os seguintes:

MAP-29, para *P.malariae* [(NAAG)₄]₄: Peptídeo contendo 4 braços com 16 aminoácidos cada um, com regiões repetitivas de 4 aminoácidos ¹²⁰.

AS-30, para *P.vivax* Tipo I (clássico) (GDRADGQPA)₂ (GDRAAGQPA)₂ (GDRADGQPA): Peptídeo com 45 aminoácidos, com 9 aminoácidos repetitivos ¹⁹, ¹²¹.

AS-27, para *P.vivax* Tipo II (VK247) (ANGAQNQPG)₄: Peptídeo com 36 aminoácidos, contendo 9 aminoácidos repetitivos ²⁰.

PL-35, para *P.vivax*-like humano (APGANQEGGAA)₃: Peptídeo com 33 aminoácidos, contendo 11 aminoácidos repetitivos ³⁰.

Denominamos os peptídeos da seguinte forma: **Pm/Pb** (*P.malariae*/*P.brasilianum*), **Pv1/Ps1** (*P.vivax* Tipo I/ *P.simum* Tipo I), **Pv2/Ps2** (*P.vivax* Tipo II/ *P.simum* Tipo II) e **Pvl/Pso** (*P.vivax*-like humano/*P.simiovale*).

4.5.5.2 Reação:

De acordo com padronização previamente estabelecida ^{118, 119}, a diluição de 1:50 foi considerada ideal para soro ou plasma humano. As seguintes concentrações de peptídeos eram utilizadas: 5 µg/ml para Pm/Pb, 10 µg/ml para Pv1/Ps1 e Pvl/Pso e 20 µg/ml para Pv2/Ps2. Os limiares de reatividade (pontos de corte) para os 4 peptídeos foram estabelecidos utilizando os resultados de 40 soros negativos do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), com as seguintes determinações (médias dos limiares de reatividade dos soros negativos acrescidas de três desvios padrão):

0,178 para *P. vivax* “clássico”, 0,297 para *P. vivax* VK247, 0,292 para *P. vivax-like* e 0,153 para *P. malariae*.

Placas de Poliestireno Polisorp/NUNC eram sensibilizadas com 100 µl/poço dos peptídeos diluídos em PBS 7,2 (0,15 M - solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M, pH 7,2) e deixadas a 4°C durante a noite.

No dia seguinte, após 6 lavagens com PBS 7,2 + 0,05% Tween 20 (PBS-T), eram bloqueadas com PBS-T-Leite 5% por 2 horas em câmara úmida à temperatura de 37°C; a seguir, a solução de bloqueio era retirada para a colocação das amostras de plasma diluído.

Os plasmas, diluídos a 1:50 em PBS-T-Leite 2,5%, eram acrescentados no volume de 100 µl/poço, permanecendo por 1 hora em câmara úmida a 37°C. Após 6 lavagens com PBS-T, seguia-se a segunda incubação, por 1 hora, com soro anti-IgG humano conjugado com peroxidase, diluído em PBS-T-Leite 2,5% (conjugado previamente titulado, para os testes dos soros humanos). Novamente, eram feitas 6 lavagens, seguidas de uma lavagem final somente com PBS 7,2. As reações eram reveladas adicionando-se 100 µl/poço de substrato azinodietil-benzotiazolino-sulfatado (ABTS).

Após 30 minutos, as reações eram interrompidas com a adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (50 µl/poço). A absorbância era obtida por leitura a 414 nm em leitor de ELISA (Multiskan MCC/340 P).

Todos os plasmas eram testados em duplicatas e os resultados expressos pela média das mesmas. Eram incluídos controles positivos e negativos em cada ensaio.

4.6 Capturas Aleatórias de Anofelíneos Peridomiciliares e Verificação da sua Infecção por *Plasmodium*:

4.6.1 Técnica de Captura:

No máximo até sete dias após a coleta de amostras da população exposta, a área de ocorrência do caso era visitada pela equipe de entomologia da Secretaria do Estado da Saúde do Espírito Santo. A equipe procedia à captura de anofelíneos, de forma pontual, em um intervalo de tempo compreendido entre 18:00 e 22:00, no domicílio e no peridomicílio do paciente. Era utilizado o aspirador de Castro para capturar os espécimes que estivessem se alimentando em moradores e animais, bem como aqueles em repouso após o repasto.

4.6.2 Identificação e Transporte em Longa Distância:

A identificação dos espécimes era realizada na Unidade de Medicina Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo de acordo com chaves de identificação da equipe de Entomologia ¹²². Após identificação, os espécimes eram acondicionados em tubos do tipo NUNC contendo álcool isopropílico, um para cada conjunto de exemplares da mesma espécie, sendo, a seguir, enviados para o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para realização de PCR para amplificação de DNA de *Plasmodium*.

4.6.3 PCR para detecção de *Plasmodium* de seres humanos em Anofelíneos:

4.6.3.1 Extração de DNA:

O DNA de um conjunto de até 10 anofelíneos da mesma espécie e região de captura era extraído conforme protocolo preconizado por Oskam et al., com pequenas modificações¹²³. Após a maceração dos insetos com 20 µl do tampão de lise [50 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, Triton X 100 1% e 10 mM ditioneitol (DTT)], seguida por ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 60°C, o macerado passava por incubação de 3 horas a 60°C com a adição de 1 µl de proteinase K (20 mg/ml), 80 µl de tampão de lise e 1% de Triton X 100 por mosquito. Após a incubação, a amostra era centrifugada por 10 minutos a 12.000 rpm. Ao sobrenadante recolhido, eram acrescentados 0,1 volume de acetato de sódio (3 M, pH 5,2) e dois volumes de etanol absoluto gelado, sendo, o mesmo, mantido durante a noite a – 20°C. A seguir, o material era centrifugado, novamente, a 4°C, por 10 minutos, a 12.000 rpm. O precipitado era lavado com etanol 70% e, depois de seco, era ressuscitado em 50 µl de T.E. (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 1 mM pH 8).

4.6.3.2 Reação de Amplificação (“nested” PCR):

Era utilizado o protocolo de Kimura et al.⁷³ com modificações de Win et al.⁷⁷. O protocolo em questão baseia-se em duas etapas sequenciais em que são empregados, na primeira reação, “primers” específicos para gênero que amplificam

um fragmento de aproximadamente 130 pares de bases. Na segunda etapa da reação, são empregados, além de um “primer” específico para gênero, “primers” específicos para *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Todos os fragmentos resultantes possuem 100 pb (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*). Os “primers” são constituídos pelas seguintes seqüências de nucleotídeos:

Primeira etapa:

Específicos para gênero: **P1UP** - 5' TCCATTCAAGAACGAAAGTTAAG 3'.

P2 – 5' GAACCCAAAGACTTTGATTTCTCA 3'.

Segunda etapa:

Específico para gênero: **P1** - 5' ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT 3'

P. falciparum: **F2** – 5' CAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATG 3'.

P. vivax: **V1** – 5' CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA 3'.

P. malariae: **M1** – 5' GGAAGCTATCTAAAAGAAACACTCATAT 3'.

A mistura para a primeira etapa consistia de 0,8 µl de cada “primer” (10 pM), 0,25 µl de dNTP mix (10 mM), 2 µl de tampão de PCR 10x (Invitrogen), 0,16 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen, 5 U/µl) e 5 µl do DNA extraído, em um volume final de 20 µl.

O produto da primeira etapa era diluído em água estéril na proporção 1:50 e, a seguir, submetido à segunda etapa. A cada tubo, era acrescentado o “primer” específico para gênero P1 em combinação com cada um dos “primers” reversos específicos para espécie (F2, V1 e M1). Para a reação, eram utilizados 2 µl de cada “primer” (10 pM), 0,62 µl de dNTP mix (10 mM), 2 µl de tampão de PCR 10x (Invitrogen), 0,16 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen, 5 U/µl) e 2 µl de DNA diluído, em um volume final de 20 µl.

O termociclador utilizado era da marca Eppendorff Mastercycle, com a amplificação obedecendo aos seguintes ciclos:

Primeira etapa:

92° C por dois minutos para desnaturação, seguidos por 35 ciclos de:

92° C por 30 segundos.

60° C por 90 segundos.

1 ciclo a 60° C por cinco minutos.

Segunda etapa:

92° C por dois minutos para desnaturação, seguidos por 18 ciclos de:

92° C por 30 segundos.

60° C por 60 segundos.

1 ciclo a 60° C por cinco minutos.

Por fim, o produto da amplificação era mantido a 4° C até ser submetido à eletroforese.

4.6.3.3 Eletroforese:

A técnica de eletroforese utilizada era a mesma descrita no item 4.5.3.3, com gel de agarose a 2%.

4.7 Geoprocessamento dos Casos de Malária Autóctone:

Para avaliar a relação entre a ocorrência dos casos de malária e a distribuição da cobertura florestal nos municípios acometidos, os locais de ocorrência de parte

dos casos foram submetidos a um processo de referência, em relação às coordenadas de latitude e longitude, por meio do “Global Positioning System” (GPS). Este sistema foi desenvolvido pelo Departamento de Defesa dos Estados Unidos inicialmente com propósitos militares, porém passou a ser amplamente utilizado por civis no mundo inteiro. O sistema consiste de sinais codificados gerados por quatro satélites e captados por um receptor em terra, o que permite a configuração de informações em três dimensões.

O local de ocorrência dos casos de malária era referenciado pelo receptor GPS 72 (Garmin corp.) por ocasião da visita da equipe de entomologia. As coordenadas obtidas foram, posteriormente, inseridas no “software” ArcGIS versão 9 (ESRI), sobrepostas à distribuição da Mata Atlântica nos diversos municípios, em mapas provenientes do Projeto GEOBASES.

4.8 Coleta de Material Biológico em Área Testemunha:

Tendo em vista a possibilidade de resultados falso-positivos na reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos contra antígenos eritrocitários de *Plasmodium*, realizamos coleta de sangue na população de uma área livre de malária. As amostras colhidas foram também submetidas à mesma reação sorológica no intuito de validar os resultados obtidos na área endêmica. Elegemos, para o procedimento, o distrito do Café, no município de Alegre, situado a sudoeste da área endêmica, a 20,7° de latitude Sul e 41,5° de longitude Oeste, distante 130 quilômetros da capital (Vitória) e 50 quilômetros do caso registrado mais ao sul na área endêmica (figura 1).

Em um dia único (18 de março de 2004), 192 moradores do distrito do Café foram submetidos a coleta de 5 ml de sangue, após esclarecimento e assinatura de termo de consentimento pós-informação (pelo morador ou seu guardião legal) (anexo 5). Como contribuição para as atividades da Vigilância Ambiental da Secretaria do Estado da Saúde do Espírito Santo, parte do material colhido seria utilizada para realização de sorologia para febre amarela. No que diz respeito à investigação de malária autóctone, o sangue total foi utilizado para a confecção de gotas espessas e esfregaços, de acordo com a técnica descrita nos itens 4.5.1 e 4.5.2, e, após extração do plasma conforme descrito no item 4.6.2, para realização de reação de imunofluorescência indireta (IFI) no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. A técnica utilizada na IFI foi aquela descrita no item 4.5.4.

4.9 Pesquisa de *Plasmodium* em símios da região:

Em concomitância aos estudos descritos acima, pesquisamos a presença de *Plasmodium* em cinco símios do gênero *Alouatta*. Quatro dos símios em questão estavam sob a guarda do Centro de Reintrodução ao Ambiente Silvestre (CEREIAS), uma Organização Não Governamental sediada no município de Aracruz (figura 1) que recebe animais recolhidos do cativeiro pela Polícia Ambiental em todo o estado. O símio restante encontrava-se temporariamente sob a guarda do Museu de Biologia Professor Mello Leitão, situado no município de Santa Tereza, por ter sofrido danos físicos acidentais. Este último símio era totalmente selvagem, tendo sido recolhido em área de floresta do próprio município. Todos os animais eram machos, adultos, membros da espécie *Alouatta guariba*.

A coleta de sangue total dos símios foi feita em veia braquial após sedação do animal com cetamina, na dose de 4 mg/kg, por veterinário com experiência em procedimentos de coleta de material biológico de espécies selvagens. Foram colhidas amostras de cinco mililitros de sangue em tubo estéril, a vácuo (Vacutainer BD®), contendo EDTA. O sangue colhido foi utilizado para confecção de gotas espessas e esfregaços, centrifugado para obter plasma e concentrado de hemácias, transportado para o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (em alíquotas de plasma e concentrado de hemácias) e submetido à PCR multiplex seguindo a mesma técnica descrita para o sangue de seres humanos (itens 4.5.1, 4.5.2 e 4.5.3). Todos os procedimentos de coleta foram realizados sob rigorosa assepsia e em conformidade com os protocolos de precaução padrão, utilizando-se material descartável. Os animais foram observados até à plena recuperação dos efeitos da sedação para garantir a sua segurança.

4.10 Análise dos dados:

Todas as informações obtidas a partir dos pacientes e da população exposta, bem como o resultado de todos os procedimentos laboratoriais, eram armazenados em banco de dados do “software” estatístico SPSS versão 8.0 (SPSS Inc.).

Para as variáveis categóricas, foram determinadas as respectivas frequências percentuais. As variáveis quantitativas contínuas foram representadas pelas medidas de posição central e de variabilidade mais adequadas, quer fossem média e desvio padrão, no caso de adequação ao modelo de Gauss, quer fossem mediana e distância interquartílica, no caso de não se adequarem ao referido modelo.

O teste de correlação de Spearman (bi-caudal) foi utilizado para avaliar a presença de correlação entre idade ou permanência na área e absorbância ao ELISA, ou entre idade ou permanência na área e título à IFI (IgM e IgG). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a presença de associação entre absorbâncias ao ELISA ou título à IFI e as seguintes variáveis: profissão, atividades profissionais relacionadas ao ambiente rural e frequência de convívio com o ambiente rural. Diferença entre proporções foi avaliada pelo Qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher, quando valores esperados foram menores do que cinco. O nível de significância considerado foi de 5%.

5 Resultados:

5.1 Pacientes:

5.1.1 Dados Epidemiológicos:

No período transcorrido entre abril de 2001 e março de 2004, sessenta e cinco pacientes com malária autóctone foram incluídos. Destes, 12 foram incluídos em 2001, 18 em 2002, 24 em 2003 e 11 em 2004. Em relação ao total de casos registrados em cada ano, incluímos 57% dos casos registrados em 2001 (12/21), 95% em 2002 (18/19), 92% em 2003 (24/26) e 35,5% em 2004 (11/31). Os baixos percentuais obtidos em 2001 e 2004 devem-se ao fato de que, nos anos em questão, o processo de inclusão não se estendeu ao ano inteiro, uma vez que o estudo foi iniciado em abril de 2001 e encerrado em março de 2004. Seis casos de malária já haviam ocorrido em 2001 antes do mês de abril e vinte casos ocorreram em 2004 após o mês de março. A distribuição por município de ocorrência nos diversos anos encontra-se na tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos casos de malária autóctone do Espírito Santo, incluídos no presente estudo, por município e ano de ocorrência

Município	2001	2002	2003	2004	Total
	Frequência (%)¹				
Santa Tereza	4 (33,3)	9 (50)	6 (25)	7 (63,6)	26 (40)
Domingos Martins	2 (16,7)	4 (22,2)	5 (20,8)	4 (36,4)	15 (23,1)
Santa Maria de Jetibá	2 (16,7)	3 (16,7)	6 (25)	0	11 (16,9)
Santa Leopoldina	2 (16,7)	0	3 (12,5)	0	5 (7,7)
Alfredo Chaves	1 (8,3)	1 (5,6)	1 (4,2)	0	3 (4,6)
Viana	1 (8,3)	0	0	0	1 (1,5)
São Roque do Canaã	0	1 (5,6)	0	0	1 (1,5)
Vargem Alta	0	0	1 (4,2)	0	1 (1,5)
Marechal Floriano	0	0	2 (8,3)	0	2 (3,1)
Total	12	18	24	11	65

⁽¹⁾ Os percentuais totalizam 100 % par a cada um dos anos considerados

A maior ocorrência de casos em Santa Tereza, Domingos Martins e Santa Maria de Jetibá se justifica pelo fato de que tais municípios compreendem a maior parte da área geográfica ocupada pela endemia, conforme pode ser observado na figura 1.

A distribuição da maior parte dos casos cadastrados no período da investigação por local provável de infecção, para os municípios de Santa Tereza, Domingos

Martins, Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina, Alfredo Chaves, São Roque do Canaã, Vargem Alta e Marechal Floriano, encontra-se no anexo 6. A tabela 3 apresenta a distribuição desses mesmos casos considerando o número de locais de ocorrência por ano para cada município.

Quanto à sazonalidade, os casos foram mais frequentes nos meses de março e abril, tanto quando avaliados de forma global (figura 3), quanto quando avaliados ano a ano (figura 4).

A média de idade dos pacientes foi de $35,1 \pm 16$ anos, tendo variado entre dois e 73 anos. A mediana foi de 38 anos, com distância interquartilica de 22 a 44,5 anos (tabela 4). Dentre os 65 pacientes, 51 ou 78,5% eram do gênero masculino. Cerca de dois terços dos pacientes morava na área rural (42 ou 64,6%). Foram informadas 30 profissões diferentes pelos pacientes cadastrados (tabela 5). Destas, as mais frequentes foram agricultor (23 ou 35,4%) e estudante (8 ou 12,3%). Em 52 pacientes, para os quais o dado foi pesquisado, de forma independente da definição de profissão, 31 (59,6%) declaravam atividades de trabalho realizadas no meio rural nos trinta dias precedendo o início dos sintomas (tabela 4). A relação entre profissão declarada e atividades de trabalho realizadas ou não no meio rural encontra-se demonstrada na tabela 6. Ao considerar a intensidade do contato com o meio rural sem levar em consideração o aspecto profissional, de 52 pacientes para os quais o dado era disponível, 35 (67,3%) declararam algum tipo de contato prolongado ou permanente nos 30 dias que antecederam o quadro (tabela 4). As atividades consideradas neste tipo de contato incluíam as realizadas cotidianamente no peridomicílio por morador de área rural, banhos de rio, buscar água ou lenha longe da casa, caminhadas prolongadas para lugares distantes, pescarias, piqueniques e

churrascos, e viagens da cidade para o sítio nos fins de semana, para aqueles que não residiam em área rural.

Tabela 3 - Distribuição do número de prováveis locais de infecção, considerando a maior parte dos casos cadastrados de malária autóctone, por ano, por município

Município	Ano				Total¹
	2001	2002	2003	2004	
Santa Tereza	3	5	3	4	11
Domingos Martins	1	3	4	3	9
Santa Maria de Jetibá	1	2	5	0	7
Santa Leopoldina	0	0	2	0	2
Alfredo Chaves	1	1	1	0	3
São Roque do Canaã	0	1	0	0	1
Vargem Alta	0	0	1	0	1
Marechal Floriano	0	0	2	0	2
Total	6	12	18	7	36

⁽¹⁾ O total em questão diz respeito a todos os locais por município. Aqueles locais que se repetem em anos diferentes não são contados mais de uma vez. Por isso, a coluna não corresponde à soma das frequências nos vários anos.

Figura 3 - Distribuição dos casos cadastrados de malária autóctone no Espírito Santo de acordo com o mês de ocorrência - abril de 2001 a janeiro de 2004

Figura 4 – Distribuição cronológica dos casos cadastrados de malária autóctone no Espírito Santo - abril de 2001 a janeiro de 2004

Tabela 4 - Principais características demográficas dos pacientes com malária autóctone no Espírito Santo - abril de 2001 a março de 2004

Característica	Média ($\pm$ DP ¹)	Mediana	Frequência (%)	P25 ²	P75 ³	Amplitude
Idade (anos)	35,11 ($\pm$ 16)	38	-	22	44,5	2 a 73
Gênero masculino	-	-	51 (78,5 ⁴)	-	-	-
Moradia em área rural	-	-	42 (64,6)	-	-	-
Agricultor	-	-	23 (35,4)	-	-	-
Estudante	-	-	8 (12,3)	-	-	-
Atividades profissionais relacionadas à agricultura	-	-	31 (59,6)	-	-	-
Ausência de deslocamentos nos últimos 2 anos	-	-	20 (30,8)	-	-	-
Sempre residiram no mesmo local	-	-	22 (33,8)	-	-	-
Ausência de episódio anterior de malária	-	-	62 (95,4)	-	-	-
Atividades cotidianas relacionadas à mata	-	-	24 (36,9)	-	-	-
Atividades cotidianas relacionadas ao meio rural	-	-	35 (67,3)	-	-	-

⁽¹⁾DP: Desvio Padrão

⁽²⁾P25: Percentil 25

⁽³⁾P75: Percentil 75

⁽⁴⁾Os percentuais se aplicam ao total de pacientes para o qual o dado era disponível

Tabela 5 - Profissões declaradas por 65 pacientes com malária autóctone no Espírito Santo - abril de 2001 a março de 2004

Profissão	Frequência
Agricultor	23
Analista de Sistemas	1
Auxiliar de Produção (carrega água mineral)	1
Bancário	1
Biólogo	1
Borracheiro	1
Braçal (serviços de terraplanagem)	1
Caseiro	1
Cinegrafista	1
Comerciante	3
Corretor de café	1
Digitador	2
Do lar	2
Empresário	1
Estudante	8
Jardineiro	1
Lanterneiro	1
Marceneiro	2
Mecânico	1
Menor	1
Militar	1
Motorista	2
Pastor (evangélico)	1
Pedreiro	1
Professor	1
Projetista elétrico (Companhia Siderúrgica de Tubarão)	1
Técnico agrícola	2
Tenente da Polícia Militar	1
Tratorista	1
Total	65

Tabela 6 - Relação entre profissão declarada e atividades de trabalho realizadas ou não no meio rural nos trinta dias que precederam o início dos sinais e sintomas para 52 pacientes com malária autóctone no Espírito Santo - abril de 2001 a março de 2004

Profissão	Atividades de Trabalho nos Últimos 30 Dias		
	Relacionadas ao	Não Relacionadas ao	Total
	Meio Rural	Meio Rural	
Agricultor	19	0	19
Estudante	3	4	7
Outras	9	17	26
Profissões			
Total	31	21	52

Se considerarmos simultaneamente as informações sobre atividades de trabalho e atividades não profissionais, de acordo com o seu vínculo com a área rural, para 53 pacientes, em cujos registros estava disponível pelo menos uma das informações em questão, 44 (83%) haviam mantido contato prolongado ou permanente, de natureza profissional ou não, com o meio rural nos trinta dias que antecederam o início dos sinais e sintomas. Os nove pacientes restantes eram moradores da área urbana que tiveram permanência fugaz no meio rural em algum momento nos 30 dias que precederam o início dos sinais e sintomas. A duração máxima desta permanência foi de um pernoite.

Quanto a deslocamentos para fora da região de moradia nos dois anos precedentes, 20 pacientes (30,8%) negaram qualquer deslocamento (tabela 4), 14 (21,5%) haviam se deslocado para outras áreas próximas, também com transmissão de malária autóctone, e 31 (47,7%) haviam se deslocado para áreas não malarígenas. Nenhuma viagem para a região Amazônica foi declarada.

Vinte e dois pacientes (33,8%) sempre haviam residido no mesmo local desde o nascimento (tabela 4). Vinte e seis pacientes (40%) haviam residido anteriormente em outros locais, mas fora da região Amazônica. Para 14 pacientes (21,5%) não dispúnhamos da informação. Apenas três pacientes informaram residência anterior na região Amazônica ou proximidades, nos estados do Pará (Paragominas), Maranhão (Itinga) e Mato Grosso do Sul (Aquidauana), todos há mais de 15 anos.

Sessenta e dois pacientes (95,4%) estavam apresentando seu primeiro episódio de malária (tabela 4). Dos três pacientes restantes, um havia adquirido malária há 38 anos, outro há 11 anos e a terceira, uma adolescente de 12 anos de idade, do município de Santa Maria de Jetibá, havia adoecido três meses antes, podendo tratar-se de recaída. Esta paciente teve dupla entrada em nosso banco de dados. Dois pacientes adicionais declararam doença febril nos seis meses precedentes. Em um dos casos, foi firmado diagnóstico de dengue. No outro, tratou-se de doença de curta duração (três ou quatro dias), com remissão espontânea.

Vinte e quatro pacientes (36,9%) declararam ter entrado na mata em algum momento nos 30 dias que antecederam o início dos sinais e sintomas da doença (tabela 4). É possível, entretanto, que um número maior de pacientes tenha feito estas incursões, negando o fato por receio de que tal atitude pudesse ser vinculada a desrespeito às leis de preservação ambiental.

Foram verificadas as possibilidades de contato dos pacientes cadastrados entre si e com outros casos de malária, considerando a viabilidade de sua inter-relação em uma mesma cadeia de transmissão. Alguma forma de contato foi observada em 11 situações. Os pacientes de número dois e três eram marido e esposa, tendo desenvolvido sintomas quase simultaneamente. Os pacientes 28 e 29 eram mãe e filho, os quais também adoeceram simultaneamente, tendo declarado a ocorrência de um caso de malária a um quilômetro de sua casa cinco meses antes. O paciente 30 soube de um caso de malária a 15 quilômetros de seu local de moradia um mês antes de adoecer. O paciente 32 havia tido contato com dois casos próximos à sua casa dois anos antes. O paciente 35 declarou contato freqüente com os pacientes 28 e 29, tendo adoecido três meses depois deles. Os pacientes 40 e 41 adoeceram simultaneamente, estando relacionados à mesma região geográfica. Os pacientes 42, 44 e 45 tinham residências próximas umas das outras, tendo adoecido entre 9 de junho e 18 de julho de 2003. O paciente 51 também morava próximo deles, mas só adoeceu em novembro do mesmo ano. O paciente 53 declarou contato com um portador de malária, proveniente da região Amazônica, trinta dias antes de adoecer. Os pacientes 52 e 59 eram pai e filho, porém moravam cerca de 100 quilômetros distantes um do outro e adoeceram separados por um intervalo de dois meses. Os pacientes 55 e 56, que adoeceram simultaneamente, também eram marido e esposa.

5.1.2 Dados Clínicos:

O intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico de malária foi, em média, de $13,9 \pm 7$ dias, variando entre dois e 40 dias (tabela 7). A febre teve padrão

episódico em 63 pacientes (96,9%). Os episódios ocorreram a cada 48 horas em 48 pacientes (73,8%) e a cada 24 horas em 15 pacientes (23,1%). Os diversos sinais e sintomas apresentados encontram-se descritos na tabela 8. Os pacientes apresentavam, em média, $8,2 \pm 2,9$ sintomas diferentes cada um, variando entre dois e 13 sintomas. O baço era impalpável em 26 pacientes (42,6%) (tabela 7). Além destes 26, um paciente havia sido esplenectomizado alguns anos antes para tratamento de esquistossomose hepatoesplênica.

Para os pacientes em que o baço era palpável, sua medida a partir da reborda costal esquerda foi, em média, de $2,7 \pm 0,7$ cm, variando entre 2 e 4 cm (tabela 7).

Tabela 7 - Características da evolução clínica dos episódios de malária autóctone do Espírito Santo para pacientes cadastrados - abril de 2001 a março de 2004

Variável	Média $\pm$ DP ¹	Mediana	Frequência (%)	P25 ²	P75 ³	Amplitude
Tempo de duração dos sintomas (dias)	$13,9 \pm 7$	14	-	9	18	2 a 40
Febre Periódica	-	-	63 (96,9)	-	-	-
Febre a cada 48 horas	-	-	48 (73,8)	-	-	-
Baço impalpável (%)	-	-	26 (42,6)	-	-	-
Tamanho do baço (cm)	$2,7 \pm 0,7$	3	-	2	3	2 a 4

⁽¹⁾ DP: Desvio padrão.

⁽²⁾ P25: Percentil 25.

⁽³⁾ P75: Percentil 75.

5.1.3 Dados Laboratoriais:

5.1.3.1 Características Morfológicas:

Esfregaços de boa qualidade técnica, possibilitando uma boa visualização das formas eritrocitárias dos parasitas, foram obtidos de 51 pacientes (78,5%). As características observadas eram compatíveis com *Plasmodium vivax* considerando-se o aumento no diâmetro da hemácia parasitada, as granulações de Schüffner e o aspecto amebóide do citoplasma (figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11). Também contribuíram para a identificação da espécie, apesar da menor especificidade, as características dos parasitas observadas em algumas gotas espessas.

As parasitemias, determinadas pela contagem das formas parasitárias observadas à gota espessa, foram menores ou iguais a 300 parasitas por microlitro em 54 pacientes (83,1%), entre 301 e 500 parasitas por microlitro em 5 pacientes (7,7%) e entre 501 e 10.000 parasitas por microlitro em 5 pacientes (7,7%). O paciente que havia sido submetido anteriormente a esplenectomia (paciente 25) apresentava parasitemia superior a 10.000 parasitas por microlitro.

Tabela 8 - Frequência dos diversos sinais e sintomas da malária autóctone do Espírito Santo observados em 65 pacientes - abril de 2001 a março de 2004

Sinal ou Sintoma	Frequência (%)
Febre	65 (100)
Cefaléia	57 (87,7)
Calafrios	56 (86,2)
Sudorese	49 (75,4)
Fraqueza	47 (72,3)
Mialgias	40 (61,5)
Lombalgia	38 (58,5)
Artralgias	34 (52,3)
Anorexia	34 (52,3)
Tontura	32 (49,2)
Dor abdominal	26 (40)
Tosse	26 (40)
Dor óssea	19 (29,2)
Vômitos	11 (16,9)

Paciente 1 - Esfregaço.

Paciente 1 – Esfregaço.

Paciente 1 – Esfregaço

Paciente 1 – Gota Espessa

Figura 5 – Características morfológicas dos parasitas observados à gota espessa e/ou esfregaço nos pacientes com malária autóctone no Espírito Santo. Paciente 1 – abril de 2001 a março de 2004

Paciente 1 – Gota Espessa

Paciente 1 - Gota Espessa

Paciente 1 – Gota Espessa

Paciente 1 – Gota Espessa

Figura 6 – Características morfológicas dos parasitas observados à gota espessa nos pacientes com malária autóctone no Espírito Santo. Paciente 1 – abril de 2001 a março de 2004

Paciente 13 - Esfregaço

Paciente 13 - Esfregaço

Paciente 13 - Esfregaço

Paciente 14 - Esfregaço

Figura 7 – Características morfológicas dos parasitas observados ao esfregaço nos pacientes com malária autóctone no Espírito Santo. Pacientes 13 e 14 – abril de 2001 a março de 2004

Paciente 14 - Esfregaço

Paciente 14 - Esfregaço

Paciente 25 – Gota Espessa

Paciente 25 – Gota Espessa

Figura 8 – Características morfológicas dos parasitas observados à gota espessa e/ou esfregaço nos pacientes com malária autóctone no Espírito Santo. Pacientes 14 e 25 – abril de 2001 a março de 2004.

Paciente 25 – Gota Espessa

Paciente 35 - Esfregaço

Paciente 35 - Esfregaço

Paciente 35 - Esfregaço

Figura 9 – Características morfológicas dos parasitas observados à gota espessa e/ou esfregaço nos pacientes com malária autóctone no Espírito Santo. Pacientes 25 e 35 – abril de 2001 a março de 2004

Paciente 35 – Esfregaço

Paciente 43 - Esfregaço

Paciente 43 – Esfregaço

Paciente 43 - Esfregaço

Figura 10 – Características morfológicas dos parasitas observados ao esfregaço nos pacientes com malária autóctone no Espírito Santo. Pacientes 35 e 43 - abril de 2001 a março de 2004

Paciente 44 - Esfregaço

Paciente 44 - Esfregaço

Paciente 44 – Esfregaço

Paciente 48 - Esfregaço

Figura 11 – Características morfológicas dos parasitas observados ao esfregaço nos pacientes com malária autóctone no Espírito Santo. Pacientes 44 e 48 – abril de 2001 a março de 2004

5.1.3.2 PCR Multiplex para *Plasmodium* de Humanos:

A técnica de PCR Multiplex foi realizada em amostras de concentrado de hemácias de 48 pacientes. Em 45 pacientes (93,8%), houve amplificação de um fragmento de 499 pb, compatível com *P. vivax*. Em um paciente (2,1%), o fragmento amplificado tinha 269 pb, indicando infecção pelo *P. malariae* (tabela 9). Em dois pacientes (4,2%), não houve amplificação. Estes resultados estão parcialmente demonstrados na figura 12.

5.1.3.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a Detecção de Anticorpos contra Estágios Eritrocitários de *Plasmodium*:

Para garantir uma melhor especificidade da técnica, optamos por considerar, como limiar de reatividade, o título de 1:80. Devido a pouca disponibilidade de antígenos de *P. malariae*, optamos por realizar IFI somente naquelas amostras que haviam sido positivas para anticorpos anti-CSP desta espécie ao ELISA. Mesmo assim, apesar de 10 pacientes terem sido positivos para a presença de anticorpos anti-CSP de *P. malariae*, apenas sete deles puderam ser avaliados pela IFI. Destes sete pacientes, seis foram positivos para anticorpos da classe IgM e todos os sete para anticorpos da classe IgG (tabela 9). Os títulos para anticorpos da classe IgM, para os pacientes positivos, apresentaram mediana de 1:960, com distância interquartílica (DQ) de 1:280 a 1:3.200 (tabela 9). Na amostra do paciente restante, não foi observada qualquer fluorescência. Para anticorpos da classe IgG, os títulos tiveram mediana de 1:640, com DQ de 1:320 a 1:640 (tabela 9). O único paciente negativo

para anticorpos da classe IgM apresentou título de 1:1.280 para anticorpos da classe IgG.

Em 50 pacientes testados na IFI para a presença de anticorpos contra *P. vivax*, 47 (94%) foram positivos para anticorpos da classe IgM e 48 (96%) para aqueles da classe IgG (tabela 9). A mediana dos títulos para anticorpos da classe IgM foi de 1:2.560, com distância interquartílica de 1:640 a 1:2.560 (tabela 9). Para os anticorpos da classe IgG, a mediana foi de 1:5.120, com distância interquartílica de 1:5.120 a 1:10.240 (tabela 9).

O anexo 7 apresenta a síntese dos resultados da PCR e da IFI para todos os pacientes avaliados.

5.1.3.4 ELISA para a Detecção de Anticorpos contra Peptídeos Sintéticos Correspondentes à Porção Repetitiva da CSP de *P. vivax* e suas variantes, e *P. malariae*:

Amostras de plasma de 50 pacientes foram submetidas à técnica de ELISA para a detecção de anticorpos contra peptídeos sintéticos correspondentes à porção repetitiva da CSP de *P. vivax*, *P. vivax* VK247, *P. vivax-like* e *P. malariae*. Em 25 (50%), o resultado foi negativo para todos os peptídeos sintéticos testados. Vários pacientes foram positivos para mais de um peptídeo. Assim, as amostras de 22 pacientes (44%) foram positivas para *P. vivax* clássico (VK 210), as de 11 pacientes (22%) foram positivas para VK 247, as de 10 pacientes (20%) foram positivas para *P. vivax-like* e as de 10 pacientes (20%) foram positivas para *P. malariae*. A mediana das absorbâncias e as respectivas distâncias interquartílicas (DQ) foram:

0,157 (DQ: 0,087 a 0,221) para *P. vivax* clássico (VK 210), 0,179 (DQ: 0,109 a 0,281) para VK 247, 0,195 (DQ: 0,135 a 0,250) para *P. vivax-like* e 0,079 (DQ: 0,057 a 0,126) para *P. malariae*.

A tabela 10 apresenta a distribuição de frequências dos resultados do ELISA nos 50 pacientes avaliados. A síntese dos resultados encontra-se no anexo 8.

Figura 12 – Técnica de Multiplex-PCR do DNA extraído dos pacientes com Malária Autóctone do Espírito Santo, cadastrados entre abril de 2001 e março de 2004. Gel de agarose a 1,5%. Coluna 1: Padrão de peso molecular (100 pb Ladder Invitrogen). Coluna 2: Controle negativo. Colunas 3 e 10: Amostras com resultado negativo. Colunas 4 a 9, 11 a 13 e 15 a 16: Fragmento amplificado de 499 bp, compatível com *P. vivax*. Coluna 14: Fragmento amplificado de 269 bp, compatível com *P. malariae*

Tabela 9 - Resultado de PCR e IFI para 50 pacientes com Malária Autóctone do Espírito Santo - abril de 2001 a março de 2004

	IFI				PCR		
	IgM <i>P. malariae</i>	IgG <i>P. malariae</i>	IgM <i>P. vivax</i>	IgG <i>P. vivax</i>	Pv ¹ (%)	Pm ² (%)	Neg (%)
Positivos/Testados (%)	6/7 (85,7)	7/7 (100)	47/50 (94)	48/50 (96)	45 (94)	1 (2)	2 (4)
Mediana dos títulos	1:960	1:640	1:2 560	1:5 120	- ³	-	-
Distância Interquartilica	1:280 - 1:3 200	1:320 - 1:640	1:640 - 1:2 560	1:5.120 - 1:10 240	-	-	-
Variação	1:160 - 1:5 120	1:320 - 1:1 280	1:80 - 1:10 240	1:640 - 1:10 240	-	-	-

⁽¹⁾ Pv: *Plasmodium vivax*

⁽²⁾ Pm: *Plasmodium malariae*

⁽³⁾ -: Não se Aplica

Tabela 10 - Resultado do ELISA para detecção de anticorpos anti-CSP em 50 pacientes com malária autóctone do Espírito Santo - abril de 2001 a março de 2004

Peptídeos	VK 210	VK 247	VL ¹	Pm ²	Nenhum	Todos
Frequência (%)						
Isolado	7 (14)	0	0	2 (4)	-	-
VK 210	-	2 (4)	3 (6)	2 (4)	-	-
VK 247	2 (4)	-	0	1 (2)	-	-
VL	3 (6)	0	-	0	-	-
Pm	2 (4)	1 (2)	0	-	-	-
VK 210 + VK 247	-	-	3 (6)	1 (2)	-	-
VK 210 + VL	-	3 (6)	-	0	-	-
VK 210 + Pm	-	1 (2)	0	-	-	-
VK 247 + VL	3 (6)	-	-	0	-	-
VK 247 + Pm	1 (2)	-	0	-	-	-
VL + Pm	0	0	-	-	-	-
Nenhum	-	-	-	-	25 (50)	-
Todos	-	-	-	-	-	4 (8)
Total	22 (36)	11 (22)	10 (20)	10 (20)	-	-

⁽¹⁾VL: *Plasmodium vivax*-like

⁽²⁾Pm: *Plasmodium malariae*

⁽³⁾ - : Não se aplica

5.1.4 Geoprocessamento dos Casos de Malária Autóctone:

As coordenadas de referência do local de moradia de 37 pacientes foram obtidas com sucesso. Conforme pode ser observado na figura 13, as localizações são coincidentes com as áreas de distribuição da Mata Atlântica, a qual, como também pode ser observado, é abundante nos municípios afetados.

a - Detalhe do mapa do Espírito Santo mostrando os municípios com maior frequência de casos de malária autóctone

b - Ampliação do detalhe mostrando os municípios

● - Casos de malária autóctone

Figura 13 – Distribuição geográfica de parte dos casos de Malária Autóctone do Espírito Santo, registrados nos municípios de Domingos Martins, Santa Maria de Jetibá e Santa Tereza, e sua relação com a cobertura florestal. Dados obtidos por Geoprocessamento – abril de 2001 a março de 2004

5.1.5 Correlações e Associações:

O teste de correlação de Spearman (bi-caudal) foi utilizado para avaliar a presença de correlação entre idade e densidade óptica no ELISA ou entre idade e título na IFI (IgM e IgG). Houve significância estatística para uma correlação negativa entre título de anticorpos da classe IgM contra *P. vivax* na IFI e idade ($R = -0,291$; $p = 0,042$). As demais correlações não atingiram significância estatística ao nível de 5%.

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis não revelou associação significativa entre títulos na IFI (para IgM ou IgG) ou absorbância no ELISA e as seguintes variáveis: profissão, atividades profissionais realizadas no ambiente rural e nível de contato com o meio rural.

5.2 População Exposta:

5.2.1 Características da Amostra:

A partir da inclusão do paciente número 14 (07/03/2002) e até à inclusão do paciente número 50 (13/11/2003), era feita coleta de amostras de sangue da população exposta, ou seja, dos habitantes das áreas de ocorrência dos casos, considerando-se um raio máximo de dois quilômetros tendo por centro o local de moradia do paciente. No período em questão, foram obtidas 1.777 amostras, com uma mediana de 46 amostras colhidas por caso (DQ: 38,75 a 50,5). A distribuição do número de amostras colhidas para cada município encontra-se na tabela 11.

Tabela 11 - Distribuição das amostras de sangue colhidas da população residente nas áreas de ocorrência de casos de malária autóctone no Espírito Santo por município de ocorrência - março de 2002 a novembro de 2003

Município	Número de amostras
Santa Tereza	546
Santa Maria de Jetibá	581
Domingos Martins	387
Alfredo Chaves	92
Santa Leopoldina	88
São Roque do Canaã	44
Vargem Alta	39
Total	1.777

A idade dos moradores submetidos à coleta foi, em média, de $31,3 \pm 20$ anos, variando entre 6 meses e 91 anos. A distribuição por gênero foi equivalente, sendo 52,3% do gênero masculino e 47,7% do gênero feminino. Quanto à naturalidade, 1.333 habitantes (75%) submetidos à coleta eram naturais dos próprios municípios de ocorrência dos casos autóctones, 290 (16,3%) eram naturais de outros municípios do estado, 144 (8,1%) de outros estados ou países e para dez moradores (0,6%) a informação não foi obtida. Apenas dois moradores eram naturais da região Amazônica, um de Belém e outro de Tameaçu, dois municípios do estado do Pará. A mediana do tempo de residência na área de coleta foi de 16 anos (DQ: 7 a 33 anos). Nos dois anos anteriores, 1.143 moradores (64,3%) submetidos à coleta haviam viajado para outros locais próximos ou distantes, porém fora da região

Amazônica. Para aquela região, viajaram 12 moradores (0,7%), seis para Rondônia e seis para outros locais. Seiscentos e vinte e dois moradores (35%) não haviam viajado no referido período de dois anos.

As características dos moradores por município de coleta encontram-se na tabela 12.

Tabela 12 – Características dos moradores submetidos à coleta de sangue nas áreas de ocorrência de malária autóctone do Espírito Santo por município de coleta - março de 2002 a novembro de 2003

Município	Idade (anos)	Gênero Masculino	Natural da área	Natural de outros locais	Natural Região Amazônica	Tempo de residência na área (anos)	Viagens nos últimos 2 anos	Viagens para Região Amazônica
	média (DP ¹)	%	%	%	%	mediana (DQ ²)	%	%
Sta. Tereza	32,9 (19,3)	59,9	56	43,9	0,1	10 (3 a 25)	66,3	2
Sta. Maria de Jetibá	29,6 (19,7)	49,2	84,9	15,2	0	16 (8 a 32)	52,2	0
Domingos Martins	32,4 (20,8)	48,3	85,8 ³	11,7 ³	0	20 (11 a 37)	66,9	0,3
Alfredo Chaves	29,3 (20,3)	53,3	81,5	18,5	0	18 (7,2 a 37,7)	85,9	0
Sta. Leopoldina	26,6 (17,6)	48,9	93,2	6,8	0	19 (11 a 41)	85,2	0
S. Roque do Canaã	35,3 (21,8)	54,5	40,9	59,1	0	18 (10,5 a 40)	90,9	0
Vargem Alta	35,3 (22,6)	35,9	69,2	30,8	0	20 (10 a 45)	92,3	0

⁽¹⁾ DP: Desvio Padrão

⁽²⁾ DQ: Distância Interquartilica

⁽³⁾ Não foi registrada a informação para 10 moradores.

O exame de todas as gotas espessas e esfregaços colhidos resultou negativo.

5.2.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a Detecção de Anticorpos contra Estágios Eritrocitários de *Plasmodium*:

Duzentas e cinquenta e três amostras foram testadas na IFI para a detecção de anticorpos da classe IgM contra *P. malariae*. Foi dada preferência a amostras positivas para anticorpos anti-CSP de *P. malariae* no ELISA. Assim, das 253 amostras, 239 (94,4%) eram positivas no ELISA. Dezenove amostras positivas no ELISA não foram submetidas à IFI. Das 253 amostras testadas, 213 (84,2%) resultaram negativas e 40 (15,8%) foram positivas, com mediana dos títulos de 1:160 e DQ de 1:80 a 1:560. A reação para a detecção de anticorpos da classe IgG contra *P. malariae* foi realizada nas mesmas 253 amostras. Cento e treze (44,6%) resultaram positivas. Os títulos obtidos nas amostras positivas apresentaram mediana de 1:320, com DQ de 1:80 a 1:2.560. O gráfico 1 apresenta os percentuais de resultados positivos para os diversos municípios. Os gráficos 2 e 3 apresentam as diferentes distribuições dos títulos.

IFI para a detecção de anticorpos da classe IgM contra *P. vivax* foi realizada em 1.701 amostras (95,8%) da população exposta. Cento e cinco amostras testadas (6,2%) foram positivas. As mesmas amostras foram também testadas para anticorpos da classe IgG, sendo obtido resultado positivo em 641 (37,7%). A mediana dos títulos das amostras positivas para anticorpos da classe IgM foi de 1:160 (DQ: 1:80 a 1:320). Para anticorpos da classe IgG, a mediana foi de 1:320 (DQ: 1:80 a 1:640). O gráfico 4 apresenta os percentuais de resultados positivos para os diversos municípios. Os gráficos 5 e 6 apresentam as diferentes distribuições dos títulos das amostras positivas.

Gráfico 1- Distribuição dos resultados da IFI para *P. malariae* por município da região de ocorrência de casos de malária autóctone do Espírito Santo - março de 2002 a novembro de 2003

Gráfico 2 - Distribuição dos títulos de anticorpos da classe IgM nas amostras positivas na IFI para *P. malariae* nos diversos municípios da área de ocorrência de malária autóctone do Espírito Santo - março de 2002 a novembro de 2003¹

Município

⁽¹⁾ Gráfico em caixa: Os quadriláteros vermelhos representam as distâncias interquartílicas. As barras horizontais, no interior dos quadriláteros ou isoladas, representam as medianas. As barras verticais nas extremidades dos quadriláteros se estendem até 1,5 vezes a distância interquartílica a partir do 3º quartil (percentil 75) ou até o limite da distribuição. Para melhor visualização, foram excluídos do gráfico dois resultados de Domingos Martins com título de 1:10 240.

Gráfico 3 - Distribuição dos títulos de anticorpos da classe IgG nas amostras positivas na IFI para *P. malariae* nos diversos municípios da área de ocorrência de malária autóctone do Espírito Santo - março de 2002 a novembro de 2003¹

⁽¹⁾Gráfico em caixa: Os quadriláteros vermelhos representam as distâncias interquartílicas. As barras horizontais, no interior dos quadriláteros ou isoladas, representam as medianas. As barras verticais nas extremidades dos quadriláteros se estendem até 1,5 vezes a distância interquartílica a partir do 3º quartil (percentil 75) ou até o limite da distribuição.

° Pontos externos: Valores atípicos situados além de 1,5 DQ a partir do 3º quartil (percentil 75). Santa Maria de Jetibá: duas amostras com título 1:5 120.

* Pontos soltos: Valores atípicos situados além de 3 DQ a partir do 3º quartil (percentil 75). Santa Tereza: cinco amostras com título 1:10 240; Domingos Martins: uma amostra com título 1:5 120 e uma amostra com título 1:10 240; Santa Maria de Jetibá: três amostras com título 1:10 240.

Gráfico 4 - Distribuição dos resultados da IFI para *P. vivax* por município da região de ocorrência de casos de malária autóctone do Espírito Santo - março de 2002 a novembro de 2003

Gráfico 5 - Distribuição dos títulos de anticorpos da classe IgM nas amostras positivas na IFI para *P. vivax* nos diversos municípios da área de ocorrência de malária autóctone do Espírito Santo - março de 2002 a novembro de 2003¹

⁽¹⁾ Gráfico em caixa: Os quadriláteros vermelhos representam as distâncias interquartílicas. As barras horizontais, no interior dos quadriláteros ou isoladas, representam as medianas. As barras verticais nas extremidades dos quadriláteros se estendem até 1,5 vezes a distância interquartílica a partir do 3º quartil (percentil 75) ou até o limite da distribuição.

* Pontos soltos: Valores atípicos situados além de 3 DQ a partir do 3º quartil (percentil 75). Santa Tereza: cinco amostras com título 1:320, uma amostra com título 1:2 560 e uma amostra com título 1:5 120; Santa Maria de Jetibá: duas amostras com título 1:2 560 e três amostras com título 1:5 120.

Gráfico 6 - Distribuição dos títulos de anticorpos da classe IgG nas amostras positivas na IFI para *P. vivax* nos diversos municípios da área de ocorrência de malária autóctone do Espírito Santo - março de 2002 a novembro de 2003¹

⁽¹⁾ Gráfico em caixa: Os quadriláteros vermelhos representam as distâncias interquartílicas. As barras horizontais, no interior dos quadriláteros ou isoladas, representam as medianas. As barras verticais nas extremidades dos quadriláteros se estendem até 1,5 vezes a distância interquartílica a partir do 3º quartil (percentil 75) ou até o limite da distribuição.

° Pontos externos: Valores atípicos situados além de 1,5 DQ a partir do 3º quartil (percentil 75). Vargem Alta: uma amostra com título 1:5.120; Santa Leopoldina: uma amostra com título 1:320.

* Pontos soltos: Valores atípicos situados além de 3 DQ a partir do 3º quartil (percentil 75). Santa Tereza: seis amostras com título 1:2 560, três amostras com título 1:5 120 e uma amostra com título 1:10 240; Domingos Martins: quatro amostras com título 1:2 560 e três amostras com título 1:5 120; Santa Maria de Jetibá: dez amostras com título 1:2 560, quinze amostras com título 1:5 120 e seis amostras com título 1:10 240; Santa Leopoldina: uma amostra com título 1:640; Alfredo Chaves: duas amostras com título 1:160, três amostras com título 1:320 e três amostras com título 1:640; São Roque do Canaã: duas amostras com título 1:640.

Por terem sido encontrados resultados positivos para *P. falciparum* na PCR (veja adiante), submetemos todas as referidas amostras positivas e um subgrupo aleatório constituído por cerca de 10% das demais amostras à IFI para detecção de anticorpos IgM e IgG contra *P. falciparum*. Assim, foram submetidas à IFI as dez amostras positivas na PCR e 182 amostras (10,2% do total) tomadas de forma aleatória entre as demais. Das amostras positivas na PCR, quatro foram positivas na IFI para anticorpos da classe IgM e três para anticorpos da classe IgG. Das amostras restantes, 26 (13,5%) foram positivas para anticorpos da classe IgM e 25 (13%) para anticorpos da classe IgG. Considerando todas as amostras positivas, a mediana dos títulos para anticorpos da classe IgM foi de 1:80 (DQ: 1:80 a 1:100). Para anticorpos da classe IgG, a mediana também foi de 1:80, mas a DQ variou entre 1:80 e 1:160. O gráfico 7 apresenta os percentuais de resultados positivos para os diversos municípios. Os gráficos 8 e 9 apresentam as diferentes distribuições dos títulos.

Como a maioria (78,5%) dos pacientes era do gênero masculino, verificamos possíveis diferenças na distribuição dos resultados positivos da população exposta quanto ao gênero. Houve predomínio do gênero masculino entre os resultados positivos na IFI para anticorpos da classe IgG contra *P. malariae* quando considerados todos os municípios em conjunto (gênero masculino: 52% positivos; gênero feminino: 37,5% positivos) ($\chi^2 = 4,81$; $p = 0,03$), porém tal predomínio não foi significativo quando considerados os diversos municípios individualmente. Predomínio do gênero masculino também foi observado na IFI para anticorpos da classe IgG contra *P. vivax* quando considerados todos os municípios em conjunto (gênero masculino: 40% positivos; gênero feminino: 35% positivos) ($\chi^2 = 4,32$; p

= 0,03) e para o município de Santa Maria de Jetibá (gênero masculino: 49,1% positivos; gênero feminino: 36,9% positivos) ($\chi^2 = 8,28$; $p = 0,004$). Para anticorpos contra *P. falciparum* na IFI, houve predomínio do gênero masculino apenas no município de Santa Maria de Jetibá quando considerados anticorpos da classe IgG (gênero masculino: 19% positivos; gênero feminino: nenhum positivo) (teste exato de Fisher; $p = 0,03$).

Gráfico 7 - Distribuição dos resultados da IFI para *P. falciparum* por município da região de ocorrência de casos de malária autóctone do Espírito Santo - março de 2002 a novembro de 2003

Gráfico 8 - Distribuição dos títulos de anticorpos da classe IgM nas amostras positivas na IFI para *P. falciparum* nos diversos municípios da área de ocorrência de malária autóctone do Espírito Santo - março de 2002 a novembro de 2003¹

⁽¹⁾Gráfico em caixa: Os quadriláteros vermelhos representam as distâncias interquartílicas. As barras horizontais, no interior dos quadriláteros ou isoladas, representam as medianas. As barras verticais nas extremidades dos quadriláteros se estendem até 1,5 vezes a distância interquartílica a partir do 3º quartil (percentil 75) ou até o limite da distribuição.

* Pontos soltos: Valores atípicos situados além de 3 DQ a partir do 3º quartil (percentil 75).

Santa Tereza: duas amostras com título 1:160.

Gráfico 9 - Distribuição dos títulos de anticorpos da classe IgG nas amostras positivas na IFI para *P. falciparum* nos diversos municípios da área de ocorrência de malária autóctone do Espírito Santo - abril de 2002 a novembro de 2003¹

⁽¹⁾Gráfico em caixa: Os quadriláteros vermelhos representam as distâncias interquartílicas. As barras horizontais, no interior dos quadriláteros ou isoladas, representam as medianas. As barras verticais nas extremidades dos quadriláteros se estendem até 1,5 vezes a distância interquartílica a partir do 3º quartil (percentil 75) ou até o limite da distribuição.

* Pontos soltos: Valores atípicos situados além de 3 DQ a partir do 3º quartil (percentil 75).

Santa Tereza: duas amostras com título 1:160; Domingos Martins: uma amostra com título 1:160.

Houve correlação estatisticamente significativa entre idade e tempo de residência na área endêmica para os moradores submetidos a coleta (teste de Spearman; $p < 0,0001$; $r = 0,6$). A idade correlacionou-se significativamente com o título de anticorpos da classe IgG contra *P. vivax* no município de Santa Maria de

Jetibá (teste de Spearman; $p = 0,02$; $r = 0,14$). Para todos os municípios em conjunto (teste de Spearman; $p = 0,057$; $r = 0,075$), a correlação aproximou-se da significância. Também esteve próxima da significância, porém em sentido negativo, a correlação entre idade e título de anticorpos da classe IgG contra *P. malariae* para o município de Santa Tereza (teste de Spearman; $p = 0,057$; $r = - 0,32$). Houve correlação estatisticamente significativa entre tempo de permanência na área endêmica e título de anticorpos da classe IgG contra *P. vivax* para todos os municípios considerados em conjunto (teste de Spearman; $p = 0,05$; $r = 0,11$) e para os municípios de Santa Tereza (teste de Spearman; $p = 0,02$; $r = 0,16$) e Domingos Martins (teste de Spearman; $p = 0,03$; $r = 0,3$). Para o município de Santa Maria de Jetibá, a correlação entre tempo de permanência na área e título de anticorpos da classe IgG contra *P. vivax* aproximou-se da significância (teste de Spearman; $p = 0,095$; $r = 0,107$). As demais correlações pelo teste de Spearman entre idade ou tempo de permanência na área endêmica e título de anticorpos (das classes IgG e IgM) contra as diversas espécies de parasitas não atingiram significância ao nível de 5%.

5.2.3 ELISA para a Detecção de Anticorpos contra Peptídeos Sintéticos Correspondentes à Porção Repetitiva da CSP de *P. vivax* e suas variantes, e *P. malariae*:

A presença de anticorpos da classe IgG contra peptídeos sintéticos correspondentes à porção repetitiva da CSP de *P. vivax* com suas variantes e *P. malariae* foi pesquisada, pelo método de ELISA, em 1702 amostras de plasma

(95,8%) coletadas da população exposta. Destas, 615 (36,1%) foram positivas para pelo menos um dos peptídeos testados. Quatrocentas e trinta e três amostras (25,4%) foram positivas para anticorpos anti-CSP de *P. vivax* clássico (VK 210), 258 (15,1%) para *P. malariae*, 108 (6,3%) para a variante VK 247 e 182 (10,7%) para *P. vivax-like*. Das amostras positivas para anticorpos anti-CSP da variante VK 247, 43 (40%) foram positivas simultaneamente para *P. malariae*. Cinquenta e uma amostras (3%) foram positivas exclusivamente para *P. vivax-like*. A distribuição dos resultados por município de ocorrência encontra-se na tabela 13. A mediana das absorbâncias e as respectivas distâncias interquartílicas (DQ) foram: 0,11 (DQ: 0,067 a 0,182) para *P. vivax* clássico (VK 210), 0,119 (DQ: 0,065 a 0,184) para VK 247, 0,138 (DQ: 0,082 a 0,213) para *P. vivax-like* e 0,062 (DQ: 0,034 a 0,111) para *P. malariae*.

Quanto à distribuição por gênero, houve maior prevalência de anticorpos anti-CSP de *P. vivax* clássico (VK 210) e de VK 247 no gênero feminino ao serem considerados todos os municípios em conjunto. Houve 28% de resultados positivos no gênero feminino e 23% no gênero masculino para *P. vivax* clássico ($\chi^2 = 5,18$; $p = 0,02$). Para a VK 247, houve 8,1% de resultados positivos no gênero feminino e 4,7% no gênero masculino ($\chi^2 = 7,85$; $p = 0,005$). Para cada município separadamente, o predomínio do gênero feminino pôde ser observado para *P. vivax* clássico em São Roque do Canaã (45% no gênero feminino e 13% no gênero masculino; $\chi^2 = 3,96$; $p = 0,04$) e para a VK 247 em Santa Maria de Jetibá (11,7% no gênero feminino e 4,9% no gênero masculino; $\chi^2 = 7,7$; $p = 0,005$). Para os demais peptídeos não houve predomínio de gênero entre as amostras positivas.

Tabela 13 – Distribuição dos resultados positivos no ELISA para detecção de anticorpos contra peptídeos sintéticos correspondentes à porção repetitiva da CSP de *P. vivax* com suas variantes e *P. malariae* em moradores das diversas áreas de ocorrência de malária autóctone do Espírito Santo por município de coleta - março de 2002 a novembro de 2003

Peptídeo	Santa Tereza	Domingos Martins	Santa Maria de Jetibá	Santa Leopoldina	Alfredo Chaves	São. Roque Canaã	Vargem Alta
% (Positivos/testados)							
Pv¹ clássico	23,1 (114/493)	24,3 (91/374)	28,8 (166/576)	21,6 (19/88)	18 (16/89)	27,9 (12/43)	38,5 (15/39)
VK 247	5,1 (25/493)	2,1 (8/374)	8,3 (48/575)	9,1 (8/88)	6,7 (6/89)	7 (3/43)	25,6 (10/39)
PL²	9,3 (46/493)	9,4 (35/374)	8,5 (49/576)	20,5 (18/88)	15,7 (14/89)	23,3 (10/43)	25,6 (10/39)
Pm³	12,4 (61/492)	19,8 (74/374)	14,6 (84/576)	15,9 (14/88)	10,1 (9/89)	14 (6/43)	25,6 (10/39)
VK 247 com Pm	44 (11/25)	87,5 (7/8)	29,2 (14/48)	12,5 (1/8)	66,7 (4/6)	0 (0/3)	60 (6/10)
PL exclusivo	2,4 (12/493)	1,1 (4/374)	2,6 (15/576)	10,2 (9/88)	5,6 (5/89)	7 (3/43)	30 (3/10)

⁽¹⁾ **Pv:** *Plasmodium vivax*

⁽²⁾ **PL:** *Plasmodium vivax*-like

⁽³⁾ **Pm:** *Plasmodium malariae*

A correlação entre absorbância ao ELISA e idade, de acordo com o teste de Spearman, foi significativa para *P. vivax*-like ao serem considerados todos os municípios em conjunto ($p = 0,02$; $r = 0,22$) e para o município de Santa Maria de Jetibá ($p = 0,01$; $r = 0,35$). Houve também significância na correlação entre absorbância no ELISA e idade para *P. malariae* para o município de Domingos

Martins ($p = 0,02$; $r = 0,26$). A correlação entre as variáveis em questão foi próxima à significância para *P. malariae* para o município de Alfredo Chaves ($p = 0,09$; $r = 0,59$), onde apenas nove amostras foram positivas. Houve correlação perfeita entre absorbância ao ELISA e idade para VK 247 para o município de São Roque do Canaã, no entanto, neste local, apenas três amostras foram positivas.

A correlação entre absorbância ao ELISA e tempo de residência na área de transmissão, pelo teste de Spearman, foi próxima da significância para *P. vivax* clássico para o município de Vargem Alta ($p = 0,09$; $r = 0,45$). Para *P. malariae* para o município de Santa Tereza, a correlação também foi próxima da significância, porém no sentido inverso (correlação negativa) ($p = 0,09$; $r = - 0,22$). Houve correlação perfeita negativa entre absorbância ao ELISA e tempo de residência na área de transmissão para VK 247 para o município de São Roque do Canaã, porém apenas três amostras foram positivas nesta situação.

5.2.4 PCR Multiplex para *Plasmodium* de Humanos:

A técnica de PCR Multiplex foi realizada em 1.527 amostras de concentrado de hemácias (85,9%) obtidas da população exposta. Em 23 amostras (1,5%), houve amplificação de um fragmento de 499 pb, compatível com *P. vivax*, 14 em Domingos Martins, cinco em Santa Tereza, três em Santa Maria de Jetibá e uma em São Roque do Canaã. Em 15 amostras (0,9%), o fragmento amplificado apresentava 269 pb, indicando infecção pelo *P. malariae*, seis em Santa Tereza, seis em Santa Maria de Jetibá e três em Domingos Martins. Em nove amostras (0,5%), o fragmento amplificado tinha 395 pb, compatível com *P. falciparum*, sete em Santa Maria de

Jetibá e duas em Santa Tereza. Em uma amostra de Domingos Martins houve, simultaneamente, amplificação de um fragmento de 269 pb e de outro de 395 pb, indicando infecção mista por *P. falciparum* e *P. malariae*. Todos os indivíduos em questão eram assintomáticos por ocasião da coleta, não albergavam parasitas identificáveis à gota espessa ou ao esfregaço e, ao nosso conhecimento, não desenvolveram sinais e sintomas de malária posteriormente. Estes resultados estão parcialmente demonstrados na figura 14.

5.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a Detecção de Anticorpos contra Estágios Eritrocitários de *Plasmodium* em Amostras coletadas de Moradores da Área Testemunha:

A mediana da idade dos moradores da área testemunha submetidos à coleta de sangue era de 16 anos, com distância interquartílica de 13 a 35 anos e limites de três e setenta e seis anos. A maioria (56,3%) era do gênero feminino. O tempo de residência na área tinha mediana de 13 anos, com distância interquartílica de 9 a 21 anos. Cento e quatro moradores (54,7%) eram naturais da própria área testemunha. Entre aqueles que tinham nascido em outros municípios ou estados, não havia ninguém natural de áreas de ocorrência de malária. Cento e trinta e oito moradores (71,9%) declararam ter viajado nos dois anos anteriores, porém não para áreas de ocorrência de malária, quer fosse no estado ou no restante do país.

Todas as gotas espessas e todos os esfregaços foram negativos para presença de *Plasmodium*. A IFI foi negativa para todas as amostras coletadas.

Figura 14 - Gel de agarose a 1,5% contendo o resultado da eletroforese dos produtos de amplificação, por multiplex-PCR, no DNA extraído dos moradores com malária autóctone no Espírito Santo, cadastrados entre março de 2002 e novembro de 2003. Números nas diversas colunas = números das amostras testadas. PM = Peso molecular (100 pb Ladder Invitrogen). Superior: 48 = *P. vivax*; 56 = *P. malariae* e *P. falciparum*; 65 a 230 = *P. malariae*. Inferior: 68 = *P. vivax*; 95 = *P. malariae*; 69, 86, 87, 92, 94, 96 e 97 = amostras negativas

5.4 Captura Aleatória de Anofelíneos Peridomiciliares e Verificação de sua Infecção por *Plasmodium*:

Ao longo de todo o período do estudo, foram capturados 785 exemplares de anofelíneos nos diversos locais de ocorrência dos casos de malária autóctone. As seguintes espécies foram identificadas: *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *evansae*, *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *strodei*, *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *lutzi*, *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *argyritarsis*, *A. (N.) albitarsis s. l.*, *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *galvaoi*, *A. (K.) cruzii*, *Anopheles* (*Anopheles*) *minor*, *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *parvus* e *A. (N.) triannulatus s. l.* Trinta e quatro exemplares capturados não puderam ser identificados, sendo classificados como *Anopheles spp.* Dos 751 exemplares restantes, 18 (2,4%) foram capturados no intra-domicílio, pertencendo às seguintes espécies: *A. (N.) albitarsis s. l.* (três exemplares), *A. (K.) cruzii* (10 exemplares), *A. (N.) evansae* (quatro exemplares), *A. (N.) galvaoi* (um exemplar). As frequências absolutas e relativas dos diversos anofelíneos capturados encontram-se na tabela 14. A distribuição por município de captura encontra-se na tabela 15.

Por meio da técnica de nested PCR, foi amplificado um fragmento de 100 pb, compatível com *P. vivax*, em uma amostra contendo sete exemplares de *A. (N.) evansae* capturados na localidade de São Bento de Urânia, no município de Alfredo Chaves.

Tabela 14 – Espécies de Anofelíneos capturados no peridomicílio dos pacientes com malária autóctone do Espírito Santo - abril de 2001 a março de 2004

Espécie	Frequência absoluta	Frequência relativa¹ (%)
<i>A. (N.) evansae</i>	233	29,7
<i>A. (N.) strodei</i>	193	24,6
<i>A. (N.) lutzi</i>	156	19,9
<i>A. (N.) argyritarsis</i>	88	11,2
<i>A. (N.) albitarsis s. l.</i>	27	3,4
<i>A. (N.) galvaoi</i>	22	2,8
<i>A. (K.) cruzii</i>	16	2
<i>A. (A.) minor</i>	8	1
<i>A. (N.) parvus</i>	4	0,5
<i>A. (N.) triannulatus s. l.</i>	4	0,5
<i>Anopheles spp.</i>	34	4,3
Total	785	100

⁽¹⁾ A soma das frequências relativas não totaliza 100% por causa do arredondamento.

Tabela 15 – Distribuição das diversas espécies de anofelíneos capturados no peridomicílio dos pacientes com malária autóctone do Espírito Santo segundo o município de captura e a situação intra ou peridomiciliar - abril de 2001 a março de 2004

Município		Eva ¹	Str ¹	Lut ¹	Arg ¹	Alb ¹	Gal ¹	Cru ¹	Min ¹	Par ¹	Tri ¹	Total
ST ²	Intra						1					1
	Peri	22	65	42	7	3	6	6	- ³	3	-	154
DM ²	Intra	4										4
	Peri	87	52	43	65	6	-	-	-	-	1	254
SMJ ²	Intra					2						2
	Peri	91	53	7		3	1	-	-		-	157
SL ²	Intra					1		10				11
	Peri	17	8	1	11	9	-		8	1	2	57
AC ²	Intra											
	Peri	9	13	51	3	3	-	-	-	-	-	79
VA ²	Intra											
	Peri	3	-	8	-	-	14	-	-	-	-	25
MF ²	Intra											
	Peri	-	2	4	-	-	-	-	-	-	1	7
Total		233	193	156	88	27	22	16	8	4	4	751

⁽¹⁾ Espécies de anofelíneos - Eva: *A. (N.) evansae*. Str: *A. (N.) strodei*. Lut: *A. (N.) lutzi*. Arg: *A. (N.) argyritarsis*. Alb: *A. (N.) albitarsis s. l.* Gal: *A. (N.) galvaoi*. Cru: *A. (K.) cruzii*. Min: *A. (A.) minor*. Par: *A. (N.) parvus*. Tri: *A. (N.) triannulatus s. l.*

⁽²⁾ Municípios - ST: Santa Tereza. DM: Domingos Martins. SMJ: Santa Maria de Jetibá. SL: Santa Leopoldina. AC: Alfredo Chaves. VA: Vargem Alta. MF: Marechal Floriano.

⁽³⁾ Espécie ausente.

5.5 Pesquisa de *Plasmodium* em símios da região:

Os quatro espécimes de *Alouatta guariba* sob a guarda do CEREIAS foram submetidos a coleta em agosto de 2003 (dois espécimes) e janeiro de 2004 (dois espécimes). O espécime selvagem sob a guarda do Museu de Biologia Professor Mello Leitão foi submetido a coleta em março de 2004.

O resultado da técnica de PCR Multiplex foi positivo para *P. malariae/brasilianum* em um dos dois símios avaliados em agosto de 2003 e no símio selvagem avaliado em março de 2004 (figura 15). Parasitas morfologicamente compatíveis com *P. malariae/brasilianum* puderam ser identificados no esfregaço fino colhido do símio avaliado em março de 2004.

Figura 15 - Gel de agarose a 1,5% contendo o resultado da eletroforese dos produtos de amplificação, pela técnica de PCR Multiplex, do DNA extraído dos símios submetidos a coleta de sangue na região endêmica de malária autóctone do Espírito Santo. A: coluna 1: Peso Molecular (100 pb Ladder Invitrogen). Coluna 2: fragmento de cerca de 269 bp, compatível com *P. malariae/brasilianum*, de amostra proveniente do símio submetido a coleta em agosto de 2003. Coluna 3: controle positivo de *P. malariae/brasilianum* de um espécimen de *Saimiri sp.* infectado experimentalmente. Coluna 4: Controle positivo de *P. vivax* obtido de um paciente. B: coluna 1: Padrão de Pesos Moleculares. Coluna 2: Controle negativo (DNA humano não infectado por *Plasmodium*). Coluna 3: fragmento de cerca de 269 bp, compatível com *P. malariae/brasilianum*, de amostra proveniente do símio submetido a coleta em março de 2004

6 Discussão:

O esforço de controle da malária no Brasil, empreendido eminentemente a partir da década de 1940 com a criação do Serviço Nacional de Malária ¹²⁴, foi bem sucedido quando se considera que a endemia passou a ser restrita à Região Amazônica. No entanto, permaneceram áreas residuais de ocorrência de casos em alguns locais da região extra-Amazônica. Estas áreas têm características peculiares no que diz respeito à cadeia de transmissão.

As estratégias de controle da malária foram amplamente baseadas na borrifação intradomiciliar de DDT ¹²⁴. O efeito residual deste inseticida reduzia o tempo de sobrevivência do vetor, impedindo que se completasse o período de pré-patogênese da doença ¹²⁵. Esta medida era eficaz para a eliminação dos vetores com comportamento endofílico, como o *Anopheles darlingi* e *Anopheles albitalis* *sl.*, ambos pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus* ¹²⁴, sendo complementada por aplicação de larvicida em criadouros peridomiciliares, também típicos deste subgênero. Entretanto, na área da chamada “bromélia malária”, abrangendo a faixa litorânea dos estados das Regiões Sul e Sudeste, o problema era bem mais complexo ¹²⁴.

Os anofelíneos responsáveis pela transmissão da “bromélia malária” pertencem ao subgênero *Kerteszia*, notadamente o *A. cruzii* e o *A. bellator* ^{63, 64, 65, 124, 126}. Eles procriam nos verticilos das bromélias, no ambiente da floresta, não podendo ser atingidos pelas técnicas usuais de combate larvário ^{49, 63, 64, 124}. Além do mais, o *A. cruzii*, principal vetor, é caracteristicamente assinantrópico, ou seja, embora capaz de invadir o ambiente domiciliar para a atividade hematofágica, ele mantém o ambiente

silvestre como seu habitat natural ^{127, 128, 129, 130}. Desta forma, é improvável que a borrifação intradomiciliar com DDT exerça ação de impacto na sua eliminação.

Diante do exposto, enquanto a malária era progressivamente “encurralada” na Região Amazônica, a área de “bromélia malária” resistia às medidas implantadas, permanecendo de forma residual. Embora a remoção manual das bromélias e o desflorestamento surtisses efeito nas áreas de floresta próximas das cidades, como no caso do estado de Santa Catarina, eram ineficazes nas florestas exuberantes das áreas rurais ^{124, 131}.

As características da malária nestas áreas residuais, entretanto, são diferentes daquelas observadas na Região Amazônica. Chamam a atenção a distância espacial e temporal entre os casos registrados, a baixa exuberância dos sinais e sintomas e a pequena quantidade de parasitas observados à microscopia ^{118, 119}. Tais características tornam difícil justificar a transmissão por meio de um mecanismo tradicional, baseado na relação hospedeiro-vetor-hospedeiro.

Os estudos empreendidos até o momento, relativos a este padrão de comportamento endêmico, não tomam como base a ocorrência de casos incidentes. Camargo ¹³² utiliza-se de metodologia do tipo Levantamento Epidemiológico para analisar os casos ocorridos entre 1980 e 1989 em duas regiões do estado de São Paulo, o Litoral Sul e o interior. Curado ¹¹⁸, em sua dissertação de Mestrado de 1995, e Curado et al. ¹¹⁹ apresentam dados relativos aos moradores das cercanias de casos já ocorridos em localidades do Vale do Ribeira, Serra do Mar e litoral norte do estado de São Paulo. Em sua tese de Doutorado, de 2003, a mesma autora utiliza um delineamento do tipo corte transversal, colhendo amostras de sangue de 318 indivíduos moradores de duas localidades do Vale do Ribeira, o Parque Estadual

Intervalos e o Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) ^{133, 134}. A mesma abordagem foi utilizada por Azevedo no município de Nova Friburgo, no estado do Rio de Janeiro ¹³⁵. Duarte, tanto em sua dissertação de Mestrado, de 1998, quanto em sua tese de Doutorado, de 2003, realiza inquérito por coleta de amostras biológicas de seres humanos supostamente expostos à possibilidade de transmissão de parasitas albergados por símios selvagens ^{136, 137}.

No presente estudo, combinamos um delineamento longitudinal, do tipo estudo de série de casos, com inquéritos, do tipo corte transversal, realizados a partir da detecção de cada caso. Tal abordagem permitiu uma melhor compreensão do curso clínico da doença, das espécies de parasitas envolvidas e das variáveis epidemiológicas associadas.

Apesar de ter sido demonstrada maior frequência de casos autóctones nos meses de março e abril (figura 4), foram registrados casos incidentes ao longo de todo o ano, mesmo nos meses mais frios. Em sua grande maioria, os afetados eram indivíduos adultos do sexo masculino com uma atividade cotidiana intimamente relacionada ao meio rural, o que sugere enfaticamente a transmissão extradomiciliar da endemia. A mesma observação foi feita por Camargo ¹³² e por Carvalho et al. ⁴⁶ para os casos ocorridos no estado de São Paulo. A ocorrência de transmissão entre os pacientes é improvável, uma vez que não houve aglomerado de casos, exceto, talvez, para aqueles de números 42, 44 e 45. A aquisição da doença na região Amazônica também é improvável, já que os acometidos negavam deslocamentos para a mesma nos últimos dois anos. Mesmo a possibilidade de recaídas muito tardias é desprovida de consistência, quando consideramos que apenas três pacientes já haviam residido na Amazônia, todos há mais de 15 anos. Apesar da negativa

sobre incursões na floresta, a relação com a mesma parece inequívoca quando são observados os dados de geoprocessamento (figura 13). Contudo, como a floresta está razoavelmente preservada na região, fazendo-se presente entre as áreas cultivadas, e como a doença também incide com uma distribuição geográfica abrangente, torna-se difícil atribuir à presença da floresta um papel preponderante na determinação da transmissão. A ausência de episódios anteriores de malária na quase totalidade dos acometidos enfatiza a característica de baixa endemicidade.

No que diz respeito à apresentação clínica, os sintomas foram exuberantes e de longa duração, mas não houve casos graves. Esta observação se opõe àquelas referentes a casos ocorridos em áreas do sistema de Mata Atlântica do estado de São Paulo, nas quais considerável proporção dos mesmos era oligossintomática ou assintomática, com baixa parasitemia detectável e evolução autolimitada^{46, 137, 138}. A razão para a discrepância entre estas observações pode estar relacionada a uma maior sensibilidade na detecção de casos em São Paulo. Como a nossa metodologia de trabalho era baseada no registro de casos pela Secretaria do Estado da Saúde, não havendo busca ativa dos mesmos, podemos ter incluído somente aqueles mais sintomáticos, permanecendo, os demais, não identificados. Contudo, tal não parece ser o caso, uma vez que, em 1.777 amostras de sangue colhidas de moradores da região por ocasião da ocorrência de cada caso, não evidenciamos nenhum parasita à microscopia. Se os casos oligossintomáticos e assintomáticos com parasitas detectáveis na microscopia estivessem permanecendo despercebidos, seria de se esperar o encontro de pelo menos alguns exames positivos entre os moradores submetidos à coleta. É possível, portanto, que a malária de Mata Atlântica do Espírito Santo tenha, de fato, um comportamento clínico diferente daquele observado

em São Paulo. A frequência relativamente baixa de baços palpáveis reflete, provavelmente, a baixa frequência de exposição à doença na área ^{139, 140}.

Concluimos ser o *Plasmodium vivax* o agente etiológico da malária em 64 dos 65 pacientes incluídos, tendo sido o paciente restante infectado pelo *Plasmodium malariae*. Esta conclusão é baseada nos aspectos morfológicos observados à microscopia (figuras 5 a 11), nos resultados de PCR Multiplex (tabela 9 e anexo 7) e nos resultados da IFI para anticorpos contra antígenos eritrocitários (tabela 9 e anexo 7). O aspecto morfológico é sugestivo de *P. vivax* em virtude do maior tamanho da hemácia parasitada, do aspecto amebóide dos trofozoítas, os quais ocupam o maior diâmetro da hemácia, e da presença de grânulos. Tais características puderam ser observadas nas lâminas preparadas a partir da coleta de 51 pacientes, embora, para aquele de número 35, as mesmas fossem equívocas. Em tal paciente, os parasitas observados, embora presentes em hemácias de maior tamanho e ocupando o maior diâmetro da hemácia, eram desprovidos de grânulos (figuras 9 e 10). Entretanto, neste caso, tanto a PCR quanto a IFI foram positivas para *P. vivax*, fazendo supor que se trate de uma forma atípica. Os estudos realizados em áreas semelhantes dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro não estabelecem as características morfológicas dos parasitas observados ^{46, 118, 119, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138}. De fato, apenas Carvalho et al. ^{46, 138} e Curado ¹¹⁸ relatam o encontro de parasitas à microscopia. Os primeiros autores não apresentam detalhes do aspecto morfológico, descrevendo-os como parasitas de “malária vivax” ^{46, 138}. Curado observou “escassos trofozoítas com aspecto de *P. vivax*” nas lâminas de apenas dois de 393 indivíduos submetidos a coleta ¹¹⁸.

No que diz respeito aos resultados, na técnica de IFI, nos 50 pacientes testados, a alta frequência de anticorpos para *P. vivax*, tanto da classe IgM (94%) quanto da classe IgG (96%), assim como a alta mediana dos títulos (1:2.560 e 1:5.120, respectivamente), corroboram a evidência encontrada na avaliação morfológica. Três pacientes foram negativos para anticorpos da classe IgM e dois para anticorpos da classe IgG. O paciente 17 tinha resultado abaixo do ponto de corte para anticorpos IgM (1:40), porém tinha altos títulos para anticorpos IgG (1:2.560). Além do mais, era positivo para o mesmo parasita na PCR. Infelizmente, as lâminas colhidas não tiveram qualidade boa o suficiente para permitir uma avaliação adequada dos aspectos morfológicos. Para os pacientes de número 60 e 65, não foi observada fluorescência, exceto para anticorpos IgM, abaixo do ponto de corte (1:40), na amostra do paciente 65. Também nestes dois casos, o diagnóstico foi firmado a partir da PCR, sendo a microscopia de pouca ajuda. Estes resultados falso-negativos na técnica de IFI refletem uma sensibilidade melhor do que a esperada para esta metodologia, a qual é relatada como sendo de 60% para o *P. vivax* em primoinfectados ⁴³ e de 71% a 96% para o *P. falciparum* ^{43, 44}. Todos os pacientes testados na IFI para *P. malariae* apresentaram resultados positivos, embora em títulos, em geral, mais baixos que para o *P. vivax*. Uma vez que, nesta técnica, foram utilizados antígenos brutos, é possível que tais resultados sejam devidos à baixa especificidade para espécie, o que também foi observado por Volney et al. na Guiana Francesa ¹¹⁴. De fato, o paciente com PCR positiva para *P. malariae* apresentou altos títulos na técnica de IFI para *P. vivax* (anexo 7). Infelizmente, a amostra do mesmo não foi submetida a teste para anticorpos contra *P. malariae* por esta técnica.

A evidência fornecida pelos resultados da PCR Multiplex pode ser considerada de grande acurácia quando tomamos por base os resultados dos diversos estudos ^{67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 141, 142, 143}. É um método em franca evolução ^{143, 144, 145}, mais sensível e mais específico para espécie do que a microscopia ^{141, 143, 146} e que tem sido, recentemente, considerado padrão ouro para o diagnóstico de malária ¹⁴⁶. Porém, apesar da presença de parasitas na microscopia, dois pacientes foram negativos na PCR. Embora a presença de inibidores ¹⁴⁷ ou a possibilidade de falha técnica devam ser consideradas, Fandeur et al. ⁹⁷, em seu estudo na Guiana Francesa, também se defrontaram com a ausência de produto detectável na PCR em amostras de símios positivos com baixa parasitemia. Considerando ser a reação capaz de amplificar outras amostras de sangue com quantidades semelhantes de parasitas, aqueles autores sugeriram que a falha na detecção de parasitas pela PCR a partir de animais positivos pela microscopia poderia ser devida a seqüências variantes nos genes pesquisados, em regiões cruciais para a ligação dos “primers”. A partir desta hipótese, os autores questionaram a possibilidade da existência de parasitas ainda não reconhecidos que estivessem infectando os símios. Este mesmo questionamento pode ser feito na presente situação. Ambos os pacientes tinham uma parasitemia de menos de 300 parasitas por microlitro. O paciente 51 tinha altos títulos de anticorpos das classes IgG e IgM contra antígenos de *P. vivax* pela técnica de IFI (1:10.240) e apresentava anticorpos anti-CSP para peptídeos sintéticos de *P. vivax* VK 210 e *P. malariae*. O paciente 60, no entanto, não tinha anticorpos detectáveis nem pela técnica de IFI, nem pelo ELISA.

Os anticorpos anti-CSP detectados pela técnica de ELISA acrescentam pouco ao diagnóstico etiológico. A CSP, presente na superfície dos esporozoítos e

constituída por uma região repetitiva central flanqueada por duas regiões não-repetitivas, parece ser essencial para a adesão e invasão da forma infectante ao tecido hepático^{14, 19, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154}. A proteína liga-se a glicosaminoglicanos presentes na região basolateral da membrana dos hepatócitos, representados principalmente pela heparina^{150, 151, 153, 154}, e o seu sítio de ligação localiza-se na região não-repetitiva próxima ao terminal 3', denominada região II-plus^{150, 152}. A especificidade da ligação é garantida pelo grau de sulfatização e pelo arranjo seqüencial dos grupos sulfato na molécula de heparina, específicos do tecido hepático^{151, 153, 154, 155}. Este processo ocorre, aparentemente, aproveitando uma via de depuração de lipoproteínas circulantes existente no hospedeiro^{154, 156, 157}. De forma surpreendente, a proteína responsável pela ligação do esporozoítio à glândula salivar do mosquito também possui domínios de ligação à heparina¹⁵⁸. A resposta imune anti-esporozoítio, do tipo humoral e celular, é direcionada para epítomos presentes fora da região repetitiva^{159, 160, 161, 162, 163, 164}. Nestas circunstâncias, a função desta última região, que configura as diferentes variantes do *P. vivax*, não é clara, tendo sido a ela atribuído um papel na evasão imune por meio de sua capacidade de induzir resposta humoral sem a participação da resposta celular¹⁶⁵. Assim, a presença de anticorpos contra a mesma não tem relação com a invasão das hemácias e, por consequência, não define a etiologia da malária em curso, embora evidências recentes demonstrem a presença de antígenos da CSP também nos estágios eritrocitários, principalmente nos merozoítos¹⁶⁶.

Anticorpos circulantes desenvolvidos contra a região repetitiva da CSP não têm efeito protetor e não guardam relação com a parasitemia patente^{17, 18, 23, 149, 168, 169, 170}. Além disso, sua presença é fugaz em decorrência de sua curta meia-vida^{17, 18, 22, 162}.

Anticorpos contra diversas variantes e espécies são encontrados simultaneamente, nos mesmos indivíduos, em diversas regiões^{23, 24, 26, 30, 31, 162, 171, 172, 173, 174, 175}. Este fenômeno, na maioria das vezes, é interpretado como a circulação simultânea de parasitas diferentes. Entretanto, apesar da alta especificidade dos peptídeos sintéticos utilizados, respostas cruzadas são possíveis^{23, 25, 176, 177, 178}. Também tem sido observada a presença de resultados negativos para todos os peptídeos sintéticos utilizados, com frequência variável^{22, 167, 169, 179}. Assim, os resultados observados nos pacientes deste estudo refletem tão-somente a sua exposição a picadas infectantes de anofelíneos e a circulação do *P. vivax*, com todas as suas variantes, e do *P. malariae* na região¹⁸⁰. Embora esperada, a alta frequência de pacientes com resultado negativo para anticorpos contra todos os peptídeos sintéticos testados permite considerar a possibilidade da circulação de variantes de *P. vivax* ainda não identificadas.

As variantes de *P. vivax*, entretanto, se diferenciam em relação a várias características biológicas. Deste modo, apresentam tropismos diferentes para diferentes espécies de vetores^{59, 173, 181, 182, 183}, a variante VK210 é mais frequente na estação chuvosa^{172, 175} e a variante VK247 é mais escassa no clima temperado¹⁸⁴. Com relação às repercussões clínicas, a VK210 parece ser mais lentamente eliminada da corrente sanguínea pela cloroquina e, aparentemente, apresenta maiores taxas de recaídas do que a VK247^{181, 185, 186}.

A falta de associação estatisticamente significativa entre os títulos de anticorpos dos pacientes e as variáveis ambientais pode ser decorrente do pequeno tamanho da amostra ou, alternativamente, de uma exposição de natureza fortuita, em que nenhum fator ambiental fosse claramente determinante. Embora os títulos de anticorpos da

classe IgM contra estágios eritrocitários de *P. vivax* fossem maiores em indivíduos mais jovens, conforme demonstrado pela fraca correlação negativa observada mediante a aplicação do teste de Spearman ($p = 0,042$; $r = - 0,291$), indivíduos positivos para este anticorpo foram encontrados em todas as faixas etárias, apenas um sendo negativo. Este dado sugere, mais uma vez, que, ocorrendo infecções agudas em todas as idades, estas sejam de natureza casual, não dependendo de uma exposição sistemática.

As amostras populacionais não foram aleatórias, mas associadas geograficamente e cronologicamente à ocorrência dos casos. Se isto, por um lado, representa um viés do estudo, por outro atende ao objetivo de detectar portadores assintomáticos, uma vez que, na teoria, estes habitantes teriam maior probabilidade de terem sido expostos da mesma maneira que o caso. A falta de um grupo controle, entretanto, torna limitada a nossa capacidade de avaliar possíveis fatores de exposição. A faixa etária destes moradores foi bastante abrangente e a sua distribuição por sexo foi homogênea. Eram, em sua maioria, indivíduos naturais dos próprios municípios, residindo no local há um longo período de tempo. Embora a maioria tivesse feito viagens nos últimos dois anos, apenas um número muito pequeno havia visitado a Região Amazônica. Desta forma, a possibilidade de haver introdutores de malária de natureza alóctone é muito remota.

Um alto percentual das amostras testadas na técnica de IFI resultou positivo para *P. vivax* e para *P. malariae*, tanto para IgM (6,2% e 15,8%, respectivamente) quanto para IgG (37,7% e 44,6%, respectivamente). Com relação ao *P. malariae*, o percentual de amostras positivas para a classe IgG ultrapassou 50% em vários municípios, chegando a mais de 60% em Santa Tereza (gráfico 1). Para o *P. vivax*, o

percentual de positivos para este anticorpo foi superior a 40% na maioria dos municípios (gráfico 4). Apesar da baixa mediana dos títulos, em algumas amostras os mesmos foram bastante elevados (gráficos 2, 3, 5 e 6). É válido o argumento de que as alíquotas testadas para *P. malariae* representavam uma sub-amostra altamente selecionada, porém o mesmo não se aplica àquelas testadas para o *P. vivax*, as quais representavam a quase totalidade da coleta.

Curado, em sua dissertação de mestrado, analisou as amostras de 393 habitantes de áreas de ocorrência de malária no estado de São Paulo pela técnica de IFI para detecção de anticorpos, apenas da classe IgG, contra *P. vivax*^{118, 119}. As áreas em questão eram localidades situadas em três regiões distintas, o Vale do Ribeira, a Serra do Mar e o litoral norte. Nas três localidades do Vale do Ribeira, o percentual de resultados positivos foi muito próximo para duas delas (54% e 52%) e menor para a terceira (24%). Chama a atenção o fato de que em duas destas localidades, Juquiazinho e Shangrilá, as características demográficas e espaciais eram muito semelhantes, e a distância muito próxima (cerca de 10 quilômetros). Contudo, os percentuais de resultados positivos foram consideravelmente diferentes (52% e 24%, respectivamente), não ficando claras as razões para tal discrepância. A região da Serra do Mar tinha características muito semelhantes às da nossa região de estudo, embora com menor densidade populacional. Nas três localidades avaliadas nesta região, os percentuais de resultados positivos foram de 38%, 28% e 7%. Aqui, chama a atenção o baixo percentual obtido na localidade de Balneário Esmeralda (7%), precisamente aquele em que o contato dos moradores com a floresta pareceu ser maior. Para o litoral norte, os percentuais em duas localidades avaliadas foram de 32% e 18%. A autora encontrou diferenças significantes entre os percentuais de

resultados positivos obtidos de moradores permanentes e de visitantes esporádicos, sendo maiores no primeiro grupo. Apesar de ter sido usado como limiar de reatividade a diluição de 1:40, ao considerar um resultado com limiar de 1:80, a autora encontrou um decréscimo na prevalência global apenas de 28% para 20,5%. Com relação ao *P. malariae*, apenas poucas amostras positivas para anticorpos anti-CSP foram testadas na IFI, todas com resultado positivo.

A mesma autora, em sua Tese de doutorado, desenvolveu a mesma metodologia em duas áreas do Vale do Ribeira, o Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) e o Parque Estadual Intervales, avaliando 318 amostras^{133, 134}. Também apenas para anticorpos da classe IgG, os percentuais de resultados positivos para *P. vivax* foram de 49% e 32%, para PETAR e Intervales, respectivamente. Se fosse utilizado, alternativamente, o limiar de reatividade de 1:80, os percentuais seriam de 41,3% e 24,5%¹³³. Para *P. malariae*, os percentuais correspondentes foram de 19% e 16%.

Azevedo, ao submeter amostras coletadas de moradores da localidade de Rio Bonito, no município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, à técnica de IFI para detecção de anticorpos da classe IgG contra antígenos eritrocitários de *P. vivax*, obteve 35,4% de resultados positivos em 65 amostras coletadas em 1996 e 47,8% de resultados positivos em 35 amostras coletadas em 1993, por ocasião de um surto de malária¹³⁵. Também, neste caso, o limiar de reatividade utilizado foi 1:40.

Duarte analisou, pela mesma técnica, 38 amostras de funcionários do Parque Estadual da Cantareira, São Paulo, em sua dissertação de mestrado¹³⁶. A razão da escolha se deveu à convivência destes funcionários com símios selvagens existentes no Parque. Os percentuais de resultados positivos para anticorpos das classes IgG e

IgM contra estágios eritrocitários de *P. vivax*, utilizando como limiar de reatividade a diluição de 1:40, foram de 10,5% e 6,2%, respectivamente. Em sua Tese de doutorado, a mesma autora analisou 216 amostras de indivíduos residentes nas proximidades da usina hidroelétrica de Porto Primavera, no município de Presidente Epitácio, região oeste do Estado de São Paulo ¹³⁷. Esta não é área de malária humana atual, embora casos tivessem sido detectados até 1993, tendo sido a coleta realizada em 2000. Também utilizando como limiar de reatividade a diluição de 1:40, a autora obteve 20,8% de resultados positivos para IgG contra antígenos eritrocitários de *P. vivax*, a maioria nas diluições de 1:40 e 1:80.

Com exceção dos estudos de Duarte, nos quais as características das amostras diferiam substancialmente das nossas, os resultados obtidos foram muito semelhantes aos que obtivemos. Desta forma, um percentual importante dos moradores de áreas de malária residual do sistema de Mata Atlântica parece ter sido infectado por parasitas da malária, quer sejam *P. vivax* ou *P. malariae*, em períodos mais ou menos recentes. Mais uma vez, pode suscitar dúvidas o fato de terem sido usados antígenos brutos dos protozoários. Entretanto, no presente estudo, a avaliação, pela mesma metodologia, de 192 amostras de moradores de uma área livre de malária, porém próxima à endêmica, não revelou qualquer resultado positivo. Aparentemente, portanto, nossos resultados são acurados no que concerne à infecção pelos protozoários em questão.

O predomínio do gênero masculino, observado entre os pacientes, se manteve entre os habitantes com resultado positivo para anticorpos da classe IgG, na técnica de IFI, contra *P. malariae* e contra *P. vivax*, embora a diferença percentual fosse

menos evidente. Não foi possível detectar outras diferenças relacionadas ao gênero, possivelmente porque o número de observações foi insuficiente.

Houve fraca correlação estatisticamente significativa entre tempo de permanência na área endêmica e título de IgG contra *P. vivax* na técnica de IFI (teste de Spearman; $p = 0,05$; $r = 0,11$), ou seja, o maior tempo de exposição está relacionado à maior probabilidade de adquirir a infecção. Embora o título não seja um bom marcador da ocorrência prévia de infecção, tal relação pode ser deduzida a partir desta análise, uma vez que a mesma considerou todos os resultados, mesmo aqueles abaixo do limiar de reatividade. Por outro lado, embora tenha se aproximado, a idade não atingiu significância em sua correlação com o título do mesmo anticorpo na técnica de IFI (teste de Spearman; $p = 0,057$; $r = 0,075$), mas apresentou uma boa correlação com o tempo de permanência na área (teste de Spearman; $p < 0,0001$; $r = 0,6$). Desta forma, o verdadeiro fator determinante deve ser o tempo de exposição, sendo a idade uma co-variável. A ausência de correlação entre idade ou tempo de permanência e anticorpos da classe IgM para este parasita, reforça a idéia de uma infecção de natureza fortuita, podendo atingir indivíduos de todas as faixas etárias. Já a ausência de correlação entre estas variáveis populacionais e os títulos dos demais anticorpos, bem como a correlação negativa entre idade e título de anticorpos da classe IgG contra *P. malariae* para o município de Santa Tereza, podem ser explicadas pelo número insuficiente de observações em alguns municípios e pela natureza de sub-amostra selecionada das alíquotas submetidas à técnica de IFI para *P. malariae*.

A técnica de ELISA para detecção de anticorpos da classe IgG contra peptídeos sintéticos correspondentes à CSP de *P. vivax* com suas variantes e *P. malariae* foi

aplicada à quase totalidade das amostras coletadas da população (1702 amostras, ou 95,8% do total). Obtivemos resultado positivo para pelo menos um dos peptídeos em 36,1% das mesmas. Para os peptídeos individuais, os percentuais foram de 25,4% para *P. vivax* clássico, 15,1% para *P. malariae*, 10,7% para *P. vivax*-like e 6,3% para a variante VK 247.

Curado, em sua dissertação de mestrado, avaliando localidades da Serra do Mar, do Vale do Ribeira e do litoral norte do estado de São Paulo, obteve percentuais bem mais baixos, sendo o maior deles o de 17,4% para *P. vivax*-like na localidade de Shangrilá, no Vale do Ribeira ^{118, 119}. Em sua Tese de doutorado, a autora obteve, no Vale do Ribeira, percentuais da ordem de 50% de resultados positivos para pelo menos um dos peptídeos testados, tendo os percentuais para os peptídeos individuais variado na faixa de 15% a 35%, dependendo da localidade e do peptídeo ¹³³. A exceção foi o percentual de resultados positivos para *P. vivax* clássico no PETAR, de apenas 7,8%.

Azevedo, ao analisar 65 amostras colhidas em 1996 e 24 em 1993 de moradores da localidade de Rio Bonito, no município fluminense de Nova Friburgo, apenas para o *P. vivax* e suas variantes, encontrou percentuais de cerca de 10% para o *P. vivax* clássico e de cerca de 4% para o *P. vivax*-like, para quaisquer dos dois anos considerados ¹³⁵. Para a variante VK 247, entretanto, o percentual foi maior em 1993, por ocasião de um surto de malária (29,2%), do que em 1996 (12,3%).

Duarte, analisando as amostras de 38 funcionários do Parque Estadual da Cantareira, em São Paulo, obteve resultados positivos para pelo menos um dos peptídeos em 31,5% das mesmas ¹³⁶. Os percentuais de resultados positivos para os peptídeos individuais foram próximos, variando de 13,1% para o *P. vivax*-like a

23,7% para cada uma das duas outras variantes de *P. vivax*. Em sua Tese de doutorado, a autora obteve percentuais de 15% a 20% de resultados positivos para pelo menos um dos peptídeos em 216 amostras obtidas de moradores da região da usina hidroelétrica de Porto Primavera, dependendo da localidade ¹³⁷. No estudo em questão, os percentuais para os peptídeos individuais foram bem menores do que os encontrados entre os funcionários do Parque Estadual da Cantareira, variando entre 3,2% para o *P. malariae* e 7,9% para o *P. vivax* clássico.

A comparação destes resultados é difícil de ser feita quando se considera a natureza dos antígenos sob exame. Os anticorpos anti-CSP têm meia-vida curta e não guardam uma relação direta com a etiologia da infecção adquirida pelos indivíduos expostos ^{17, 18, 22, 23, 149, 162, 168, 169, 170}. Assim, na melhor hipótese, denotam a circulação do *P. vivax*, com todas as suas variantes, e do *P. malariae* nas diversas áreas residuais do sistema de Mata Atlântica. Chamam a atenção os resultados de Duarte ¹³⁷ para os moradores de área atualmente livre de malária, sugerindo que, mesmo um baixo percentual, continua exposto à inoculação de esporozoítos por picadas de vetores infectados.

Cento e oito das 1702 amostras testadas (6,3%) reagiram contra peptídeos sintéticos correspondentes à CSP da variante VK 247 de *P. vivax* no presente estudo. Entretanto, 43 destas 108 (38,9%) reagiram concomitantemente contra peptídeos sintéticos correspondentes à CSP de *P. malariae*, podendo ter ocorrido reações cruzadas como as que foram evidenciadas no estudo de Cochrane et al. ²³. Merece destaque o encontro de 51 amostras positivas exclusivamente para o *P. vivax*-like, o que, pelo nosso conhecimento, não tem precedente em literatura ^{30,31}. O predomínio de resultados positivos no ELISA para o gênero feminino no que diz respeito a vários

peptídeos sintéticos é difícil de interpretar. Provavelmente está relacionado a alguma variável de confusão não identificada.

Evidenciamos, pela técnica de PCR, a presença de DNA de *P. vivax* em 23 moradores assintomáticos da área endêmica (1,5% da amostra testada), bem como de *P. malariae* em 15 amostras (0,9%), de *P. falciparum* em nove amostras (0,5%) e de *P. falciparum* e *P. malariae*, simultaneamente, em uma amostra. Curado ¹³³ e Curado et al. ¹³⁴ também encontraram amostras positivas para DNA de *Plasmodium*. Em Intervalos, foram duas amostras positivas para *P. falciparum* e uma para *P. malariae*, enquanto no PETAR foram três simultaneamente positivas para *P. falciparum* e *P. vivax* e uma positiva exclusivamente para *P. falciparum*.

A existência de pacientes assintomáticos portadores de parasitas da malária na corrente sangüínea não pode mais ser considerada exclusividade de áreas holoendêmicas e de transmissão estável. O conceito tradicional de que a presença de parasitas circulantes na ausência de sintomatologia reflete longa exposição à transmissão e, em consequência, alto nível de imunidade ^{187, 188, 189}, tem sido desafiado por evidências contrárias ^{190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202}. Com efeito, o advento da PCR tornou possível demonstrar a presença de parasitas indetectáveis pela microscopia em habitantes de áreas até mesmo hipoendêmicas ^{198, 200, 201} e de transmissão instável ^{194, 198, 199, 201}. Nessas áreas, a razão entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos tem variado entre 1:1,4 para o *P. falciparum* em Iquitos, no Peru ²⁰⁰, e 1:20 para o *P. vivax* em Ji-Paraná, Rondônia ¹⁹⁸. Ainda, infecções assintomáticas foram detectadas mesmo em indivíduos não-imunes, precedidas por período sintomático ¹⁹⁰ ou não ¹⁹³, e em residentes de áreas com transmissão de baixa intensidade ²⁰². Existe relação com exposição de longa

duração, porém não equivalente a diversas décadas. De fato, a observação de migrantes provenientes de área livre de malária e estabelecidos em área endêmica permitiu observar que dois anos de exposição eram suficientes para propiciar aos mesmos a mesma imunidade que aquela apresentada pelos moradores originais ^{191, 197}. Entretanto, entre estes mesmos migrantes, a intensidade da resistência à infecção era proporcional à faixa etária, de forma similar ao que acontecia com a população original ^{191, 197}. Ao que parece, portanto, os diferentes níveis de proteção observados nas diferentes faixas etárias são mais decorrentes da maturidade do sistema imune do que da duração da exposição ¹⁹². As infecções assintomáticas, de forma independente da maior ou menor intensidade dos sintomas entre aqueles que os desenvolvem, o que reflete mais o nível de imunidade, parecem ocorrer em todas as faixas etárias, mesmo nas áreas com transmissão mais intensa ^{195, 196}.

As evidências discutidas até aqui sugerem que o processo de desenvolvimento de imunidade parcial entre os expostos à infecção pelo *Plasmodium* não é tão linear e progressivo quanto se poderia supor. Alternativamente, este processo parece estar sujeito à influência de diversas variáveis, como as condições de transmissão e as características genéticas, tanto dos hospedeiros quanto dos parasitas. Em relação ao hospedeiro, os polimorfismos dos eritrócitos, como o traço falcêmico ^{203, 204, 205, 206, 207}, a α -talassemia ^{203, 206}, o grupo sanguíneo O ²⁰⁸ e os caracteres heterozigótico e hemizigótico para a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) ^{203, 206, 208, 209} são protetores, enquanto outros, como o caráter homozigótico para esterase D, favorecem a maior morbidade ²⁰⁸. A presença de um dos alelos do grupo sanguíneo Duffy é condição determinante para a infecção pelo *P. vivax* ²⁰⁸. Destes

polimorfismos, a deficiência de G6PD parece estar associada com maior frequência de malária assintomática^{208, 209}.

A intensidade da parasitemia naqueles infectados pelo *P. falciparum* se agrega em nível familiar e está relacionada à frequência de infecção pelo *P. malariae*, o que sugere um controle, regulado em nível genético, sobre a multiplicação de ambos os parasitas²¹⁰. De fato, traços genéticos, como a presença do HLA-B53, protegem contra a gravidade da doença^{203, 211, 212, 213}. Em indivíduos com este alelo, há maior reconhecimento, por parte do sistema imune, do antígeno de superfície específico do estágio hepático, o LSA-1²¹². A região cromossômica 5q31-q33, por meio do marcador D5S636, situado próximo aos genes responsáveis pela síntese das citocinas interleucina (IL)-4 e IL-12, exerce efeito regulador sobre a resposta imune contra os parasitas da malária^{203, 205, 214, 215}. Mutações nos genes que codificam a síntese do Fator de Necrose Tumoral (TNF)-a e a molécula receptora ICAM-1, por outro lado, predispõem à gravidade da condição clínica²⁰³, porém, indivíduos heterozigotos para o alelo TNF-a-238A albergam um maior número de genótipos de *P. falciparum* em infecções assintomáticas²⁰⁹ e outros polimorfismos deste mesmo gene são igualmente protetores²⁰³. Alguns alelos dos genes que codificam proteínas de ligação, como a ICAM-1 e a MBL também conferem proteção em relação às manifestações clínicas da doença²⁰³.

A influência das características genéticas do hospedeiro é traduzida pelas características da resposta imune no mesmo, tanto a celular quanto a humoral. O substrato genético atua na regulação da resposta imune por meio de células reguladoras, de anticorpos neutralizantes (anti-toxinas) e de moléculas efetoras auto-reguladoras²¹⁶. Em relação à imunidade celular, existe uma tendência para que a

hemozoína estimule a produção de TNF- α e IL-10^{192, 217}. A IL-10, por sua vez, deprime a produção de IL-12^{192, 216}. Porém, o substrato genético pode modificar este padrão de resposta. Além da hemozoína, o fator de crescimento tumoral (TGF)- β e a natureza dos imunocomplexos circulantes também exercem influência sobre os níveis de TNF- α ²¹⁸. O resultado final irá depender da relação entre IL-10 e IL-12. A tolerância à parasitemia e a malária assintomática são diretamente proporcionais aos níveis de IL-12^{217, 218, 219}. Tanto a malária grave, de uma forma geral, quanto a anemia grave relacionada à malária estão associadas a baixos níveis de IL-12, porém, na anemia grave, os níveis de IL-10 e TNF- α também estão reduzidos^{217, 218, 220, 221}. O TGF- β , por sua vez, contribui favorecendo a redução da parasitemia²¹⁸. Deste modo, a complexa relação resultante é a de razões TGF- β /IL-12 e IL-10/IL-12 elevadas, mas razões TGF- β /TNF- α e IL-10/TNF- α reduzidas, na malária grave²¹⁸. Esta última razão é preditiva de anemia grave e malária cerebral quando inferior a um e de parasitemia alta quando elevada²²². A razão menor que um está associada a mutação na posição 238 do promotor do gene que codifica o TNF- α ²²². De forma paradoxal, o perfil de resposta imune Th1 pode estar relacionado a redução da parasitemia concomitante à acentuação dos danos causados pela doença²⁰⁵, porém existe ganho de imunidade nas crianças por volta dos 36 meses de idade mediante a transição de uma resposta do tipo Th2 para uma do tipo Th1¹⁹². Por outro lado, em uma situação de isodensidade parasitária, a probabilidade de ser sintomático aumenta com a idade²²³.

Com relação à imunidade humoral, diferentes subclasses de anticorpos dirigidos contra antígenos diferentes de regiões diferentes do parasita influenciam a contagem de formas circulantes²²⁴. Anticorpos dirigidos contra antígenos de baixo

peso molecular inibem a penetração do merozoíto no eritrócito, enquanto aqueles dirigidos contra antígenos de alto peso molecular não inibem ²²⁴. Crianças com menos de 12 anos de idade produzem anticorpos principalmente contra antígenos de alto peso molecular, enquanto aquelas com mais de 12 anos o fazem contra antígenos de baixo peso molecular ²²⁴. A situação de malária assintomática é associada a níveis elevados de auto-anticorpos ²²⁵, produção de anticorpos anti-glicosilfosfatidilinositol ²²⁶ e presença de anticorpos IgG1 contra o antígeno MSP1₁₉ ²²⁷. Os anticorpos anti-glicosilfosfatidilinositol, entretanto, não são determinantes absolutos, uma vez que crianças de 1 a 4 anos de idade também podem apresentar malária assintomática, mas produzem baixas quantidades deste anticorpo ²²⁸. A subclasse do anticorpo também é importante. Assim, anticorpos das subclasses IgG1 e IgG3 contra o antígeno apical de membrana do *P. vivax* (PvAMA1) são protetores ²²⁹. A mesma resposta também é protetora quando dirigida contra o fragmento de 19 kDa do antígeno PvMSP-1 ²³⁰. A transição para uma resposta IgG1 e IgG3 é favorecida, de forma independente, pela exposição e pela maturidade do sistema imune ²³¹.

O protozoário, por sua vez, apresenta diferentes epítomos que lhe conferem níveis diferentes de virulência. Assim, os habitantes de área endêmica que desenvolvem anticorpos contra a família de proteínas do *P. falciparum* denominada RIFIN (repetitive interspersed family), expressa na superfície dos eritrócitos aderidos, têm mais sucesso na eliminação do parasita ²³². Mutações na sequência do gene para a síntese do antígeno apical de membrana do *P. falciparum*, expresso na superfície do esporozoíto, ocorrem em regiões diferentes para sintomáticos e assintomáticos ²³³. Além disto, estas mutações são diferentes para adultos e crianças e a mutação Glu¹⁸⁷ está associada com maior morbidade em crianças e com infecção sintomática em

adultos²³³. Gestantes negativas para anticorpo anti-MSP-1₁₉ e anticorpo anti-ligante para condroitin-sulfato A, assim como gestantes com altos títulos de anticorpos anti-CSP, anti-LSA-1 e anti-RESA (antígeno presente na superfície de eritrócitos que albergam formas em anel) têm maior risco de infecção placentária²³⁴. Diferentes alelos do gene responsável pela síntese do antígeno EBA-175, que medeia a ligação do parasita com resíduos de ácido siálico da glicoforina, são encontrados em diferentes apresentações clínicas²³⁵. Desta forma, o segmento F é mais freqüente, mas o segmento C é mais associado a malária grave²³⁵. Os assintomáticos, por sua vez, têm uma freqüência maior da presença simultânea de ambos os fragmentos²³⁵, embora, em um estudo, a freqüência maior em assintomáticos tenha sido do fragmento F e as infecções mistas estivessem associadas à presença de sintomas²³⁶. As diferentes formas clínicas da malária por *P. falciparum* também estão relacionadas aos diferentes tipos de PfEMP1, o complexo protéico responsável pela adesão, presente na superfície do eritrócito infectado^{237, 238, 239}. Este complexo protéico representa o produto de síntese dos genes *var*, sendo os diferentes tipos de expressão denominados antígenos variantes de superfície (VSA)^{237, 238, 239}. O tipo relacionado à malária grave é o VSA_{sm}, acompanhado pela regulação positiva dos genes *var* do grupo A, enquanto aquele relacionado tanto à malária não-complicada quanto à infecção assintomática é o VSA_{um}^{237, 238, 239}. Existem cerca de sessenta genes *var* agrupados em três subgrupos, designados A, B e C. A prevalência destes subgrupos varia conforme a região e a sintomatologia apresentada. Assim, em Papua Nova Guiné, por exemplo, as crianças sintomáticas albergam principalmente parasitas com genes *var* do grupo B, predominando o grupo C naquelas assintomáticas²⁴⁰. Na Tanzânia, entretanto, os genes *var* dos grupos A e B também

predominaram na malária sintomática, mas os do grupo C foram equitativamente distribuídos ²⁴¹. Adicionalmente, a resposta humoral contra os antígenos Pfs230 e Pf 48/45 reduz a transmissão da malária em mais de 50%, enquanto a resposta isolada contra o Pf 48/45 a reduz em mais de 90% ²⁴². Por fim, um grupo de genes denominado R45-FIKK quinase tem, aparentemente, um papel na remodelação do eritrócito infectado e está relacionado à virulência do protozoário ²⁴³.

As infecções pelos protozoários do gênero *Plasmodium* são frequentemente policlonais, o que é um impedimento para o desenvolvimento de imunidade, uma vez que um novo clone pode desencadear doença em um hospedeiro que já desenvolveu defesas contra os anteriores. Desta forma, a complexidade antigênica presente nas infecções varia inversamente com a idade ²⁴⁴. Nas infecções assintomáticas, há seleção do genótipo infectante, sendo fator desencadeante de sintomas a co-infecção por um genótipo diferente ²⁴⁵. Também, *in vitro*, o *P. falciparum* em cultivo prolongado tende à monoclonalidade, sendo os genótipos sobreviventes aqueles que conseguiram evadir-se do sistema imune do hospedeiro original. Com efeito, nestas circunstâncias, os parasitas são mais facilmente inibidos por anticorpos heterólogos do que por homólogos ²⁴⁶. Entretanto, a diversidade de genótipos é a ocorrência mais frequente em áreas endêmicas, mesmo aquelas mais isoladas ^{247, 248}. Porém, quando predomina um genótipo, há maior frequência de sintomas leves ou de ausência de sintomas entre os acometidos ^{202, 245}. Muitas vezes, tal predomínio ocorre em função de um fator de natureza externa, como o uso de drogas antimaláricas. Parasitas resistentes têm mais vantagem de sobrevivência, mas, sobrevivendo, acabam por ser menos virulentos do que os clones originais ²⁰². Nem sempre este comportamento pode ser atribuído ao desenvolvimento de imunidade por

parte do hospedeiro, podendo indicar, tão-somente, expressão de antígenos de baixa patogenicidade no clone resultante. O surto de malária por *P. falciparum* ocorrido no município de Governador Lindenberg, no norte do Espírito Santo, nos meses de março e abril de 2004, ilustra bem esta última situação (Secretaria do Estado da Saúde do Espírito Santo, dados não publicados). Entre os trinta e nove casos da doença detectados, a maioria apresentava-se com sinais e sintomas leves a moderados, embora todos fossem indivíduos não-imunes. O introdutor não foi identificado, mas possivelmente tratava-se de indivíduo que albergava um ou mais clones do parasita já selecionados no que diz respeito à sensibilidade aos antimaláricos, talvez por múltiplos abandonos de tratamento. Este fato pôde ser constatado quando diversos pacientes da área do surto apresentaram recrudescências, necessitando serem tratados com esquemas alternativos.

Em conjunto, estas evidências sugerem que as infecções assintomáticas sejam parte integrante do espectro de manifestações da malária, ocorrendo em maior ou menor frequência quaisquer que sejam as condições de transmissão. Neste contexto, não deve causar surpresa o fato de termos encontrado moradores albergando parasitas sem apresentar sintomas, mas sim o fato de termos encontrado **tão poucos** assintomáticos em uma área endêmica de malária humana. Mesmo a presença de DNA de *P. falciparum* evidenciada pela PCR em alguns moradores não deve ser vista como uma ocorrência de natureza extraordinária. Conforme os argumentos até aqui apresentados, tais parasitas podem ser clones de baixa virulência, circulando com baixa frequência e passando despercebidos frente ao sistema de vigilância passiva empregado pela Secretaria de Estado da Saúde. De fato, o percentual de indivíduos positivos na técnica de IFI para anticorpos contra antígenos eritrocitários

deste parasita foi consideravelmente mais baixo do que para os demais (gráfico 7). Os baixos títulos observados (gráficos 8 e 9) fazem supor, inclusive, que tais resultados sejam resultantes de respostas de natureza cruzada.

Alternativamente, o *P. falciparum* encontrado neste e em outros locais do sistema de Mata Atlântica pode ter uma origem diferente. Durante as diversas fases do seu extenso estudo sobre malária símia no Brasil, Leônidas Deane e seus numerosos colaboradores defrontaram-se com protozoários do gênero *Plasmodium* cuja espécie não eram capazes de determinar ⁹⁶. Tais protozoários foram encontrados isoladamente (cerca de 3% das amostras avaliadas) ou em concomitância com o *P. brasilianum* (cerca de 0,5% das amostras) ⁹⁶. Mais tarde, Volney et al. ¹¹⁴, em seu estudo na Guiana Francesa, encontraram um alto percentual (82,7%) de símios positivos para anticorpos contra estágios eritrocitários de *P. falciparum*. Também Gozalo et al. ²⁴⁹, em 35 símios oriundos da Amazônia peruana, encontraram seis positivos para anticorpos da classe IgM e quatro para aqueles da classe IgG contra antígenos específicos do *P. falciparum*, como o MSP-1₁₉, o SPf 66 e a porção repetitiva da CSP. Mais recentemente, Duarte ¹³⁷ e Duarte et al. ²⁵⁰ também evidenciaram a presença de anticorpos contra estágios eritrocitários de *P. falciparum*, com frequência variável, em diversas regiões do Brasil. Duarte ¹³⁷ encontrou, inclusive, DNA de *P. falciparum* em duas amostras de símios da região da usina hidroelétrica de Porto Primavera. Chimpanzés e gorilas, na África, podem ser infectados pelo *P. reichenowi*, um parasita que, embora semelhante, não é idêntico ao *P. falciparum* ^{82, 83, 251}. Da mesma forma, os símios do Novo Mundo podem estar albergando um parasita semelhante, talvez o *P. reichenowi*, ou o próprio *P. falciparum*. Este parasita, quando transferido para seres humanos, em virtude da

falta de adaptação ao novo hospedeiro, teria dificuldades para multiplicar-se em magnitude suficiente a ponto de causar doença ⁹³.

As alterações ambientais promovidas pelo homem têm modificado o comportamento dos diversos anofelíneos. Estas alterações, além de favorecer a diversidade das espécies ^{252, 253, 254, 255}, propiciam a sua participação na cadeia de transmissão da malária. O próprio *A. darlingi*, vetor outrora essencialmente endofílico, antropofílico e endofágico ⁴⁹, tem apresentado decréscimo de prevalência nas áreas alteradas ^{10, 254} e sofrido mudanças em seu comportamento. Agora, o *A. darlingi* faz o repasto principalmente no peridomicílio acompanhado por outras espécies que têm sido encontradas infectadas ²⁵⁶. De fato, a infecção de outros anofelíneos por parasitas da malária tem sido observada já há muito tempo ^{10, 51, 52, 254, 257, 258, 259, 260}. Da mesma forma, estas outras espécies foram, no passado, infectadas experimentalmente ^{261, 262, 263, 264}. Estes vetores secundários têm participação na cadeia de transmissão da malária provavelmente apenas quando um vetor importante iniciou alguma epidemia ¹⁰, porém, nas ocasiões em que a transmissão ocorreu na ausência do *A. darlingi*, a presença de tais vetores pode ter sido suficiente para mantê-la ²⁶⁵. Eles têm diferentes preferências quanto às fontes de repasto, mas, quando a oportunidade surge, todos podem fazê-lo no homem ^{264, 266}. Alguns autores, inclusive, defendem a hipótese de que qualquer espécie do subgênero *Nyssorhynchus* pode atuar como vetor nas circunstâncias adequadas ^{267, 268, 269}.

Na região extra-Amazônica, as modificações ambientais também têm favorecido a diversidade de espécies. Nas áreas preservadas, há menor número das mesmas, com predomínio absoluto do *A. cruzii* ^{129, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276} e, quando

numerosas, estas espécies diferem daquelas encontradas em ambiente alterado, sendo representadas por anofelíneos que mantêm uma relação mais íntima com o ambiente florestal^{277, 278}.

As espécies de anofelíneos obtidas por capturas aleatórias realizadas no peridomicílio, no presente estudo, certamente não representam toda a fauna anofélica local, porém permitem um vislumbre daquela que está relacionada ao ambiente antrópico (tabelas 14 e 15). São espécies típicas do ambiente alterado pelo homem, uma vez que procriam em áreas de vegetação secundária^{264, 266, 279}. Esta particularidade está relacionada à sua versatilidade, já que se adaptam a múltiplos tipos de criadouros^{263, 264, 266, 267, 268, 279, 280, 281, 282, 283, 284}. Desta forma, sua distribuição e a frequência relativa de cada espécie são muito semelhantes nas várias áreas ocupadas pelo homem na região extra-Amazônica^{257, 261, 280, 284, 285, 286, 287}. Nestas situações, a espécie predominante é, invariavelmente, o *A. strodei*²⁸⁷. Além disso, são espécies exofílicas e zoofílicas^{10, 124, 254, 257, 263, 264, 266, 267, 268, 281, 284, 288, 289, 290, 291, 292}, de hábitos crepusculares vespertinos^{10, 252, 260, 264, 266, 291, 293, 294}, com exceção do *A. galvaoi*, com atividade ao longo de toda a noite^{291, 292}, e que compartilham frequentemente os mesmos criadouros^{257, 263, 264, 266, 279, 282, 284, 295}. São espécies que se distribuem em áreas do interior, mais afastadas do litoral^{279, 287}. Nas áreas do sistema de Mata Atlântica, sua densidade é frequentemente maior no extradomicílio do que no peridomicílio²⁷⁵.

O *A. strodei*, apesar de procriar em diversos tipos de criadouros^{264, 281}, tem preferência por aqueles que possuem plantas aquáticas^{264, 267}. É um anofelíneo frequentemente encontrado nas altitudes elevadas^{264, 266, 282} e que tolera bem temperaturas mais baixas²⁸². Nas capturas, tem sido mais freqüente na estação

chuvosa ²⁹². Embora com ampla distribuição, é pouco freqüente na região Amazônica ²⁹². Pode penetrar nas moradias, onde, por vezes, é capturado ^{267, 282, 286, 290, 296}. Já foi infectado experimentalmente por *P. vivax* ^{261, 264} e encontrado naturalmente infectado por este mesmo parasita ^{10, 259, 260}, sendo considerado, portanto, vetor potencial ^{10, 124, 267, 268, 292, 297}. É possível que, quando em grande número, possa ter alguma importância na transmissão da malária ²⁶⁴.

O *A. evansae* também é mais freqüente na estação chuvosa ^{49, 264, 291, 292} e pode ser capturado no interior das moradias ^{271, 291, 293}, apresentando picos de atividade ao entardecer e ao amanhecer, às vezes durante toda a noite ²⁶⁴. Contudo, é mais zoofílico do que o *A. strodei* ²⁵⁷. Da mesma maneira que o *A. strodei*, já foi infectado experimentalmente pelo *P. vivax*, evoluindo a infecção até à fase de esporozoítos ²⁶². Encontrado naturalmente infectado ²⁵⁷, também é considerado um vetor potencial ^{124, 268, 291, 293, 297}. No presente estudo, foi a única espécie em que se detectou a presença de DNA de *P. vivax*.

O *A. lutzi* é uma espécie de comportamento mais silvestre ^{267, 273, 276}, embora já tenha sido capturado no interior de moradias ²⁷¹, sendo bastante encontrado em maiores altitudes ²⁷⁹. Não tem, até o momento, sido particularmente incriminado na transmissão da malária.

O *A. argyritarsis* é uma espécie resistente às adversidades do ambiente, cujas larvas suportam bem grandes variações de pH e temperatura ²⁹⁰. Versátil, pode procriar inclusive em recipientes artificiais ^{264, 266, 267, 280, 298}. Também pode ser capturado no interior das moradias ^{280, 284, 286, 299} e em todos os horários ²⁹², mas sua participação como vetor da malária tem sido considerada improvável ^{266, 267, 279, 300}.

As larvas do *A. albitarsis s. l.* são mais exigentes em relação às características dos criadouros, não tolerando grandes variações de pH e temperatura²⁹⁰ e preferindo coleções de água que contêm plantas aquáticas^{264, 266, 267, 281, 283}. Prolifera melhor nos meses quentes^{252, 279, 280, 301} e seus ovos eclodem menos em temperaturas mais baixas³⁰², porém os adultos convivem bem com um clima mais frio²⁶⁶. Prefere as altitudes intermediárias (até 400 metros)²⁶⁴, mas pode ser encontrado em maiores altitudes (cerca de 900 metros)²⁶⁶. Por vezes é claramente antropofílico²⁹⁵, outras, nem tanto^{257, 303}, e outras, ainda, simultaneamente zoofílico e antropofílico^{252, 282, 284, 296, 299, 304}. É, muitas vezes, endofílico^{264, 267}, podendo fazer o repasto até mesmo durante o dia^{279, 290}, porém, em outras ocasiões, prefere o ambiente silvestre^{284, 305}. É difícil dizer até que ponto estas variações de comportamento estão relacionadas às diferentes prevalências das espécies crípticas, no entanto, Forattini et al.^{306, 307} e Kakitani e Forattini³⁰⁸ observaram que o comportamento das espécies A e B podia ser igualmente antropofílico quando as condições ambientais, modificadas pelo homem, eram propícias. Tais observações referiam-se a áreas de agricultura de irrigação onde o anofelíneo procriava e, embora permanecesse exofílico, fazia o repasto em seres humanos. Assim, mesmo espécies crípticas consideradas de baixo potencial vetorial podem vir a atuar como transmissoras em circunstâncias apropriadas. De uma forma geral, o *A. albitarsis s. l.* é considerado vetor da malária, pelo menos possível^{124, 284, 285, 291, 294, 300, 309, 310}. Em nossa área de estudo, a densidade deste anofelíneo foi baixa, entretanto, o mesmo foi encontrado, algumas vezes, no intradomicílio (tabela 15).

Entre as outras espécies capturadas neste estudo, o *A. galvaoi* já foi encontrado naturalmente infectado por *P. vivax*^{10, 259}, o *A. parvus* tem características mais

silvestres, embora possa fazer o repasto em seres humanos ^{267, 288}, e o *A. minor* pode procriar em riachos com corredeiras, freqüentes nesta região de relevo acidentado ³¹¹. O *A. cruzii*, representante do subgênero *Kerteszia*, reconhecido transmissor nas áreas de “bromélia malária” ^{63, 64, 65, 124, 126} e vetor de malária símia ^{86, 87, 95, 96, 99, 100, 101}, apresentou-se em baixa densidade nas capturas realizadas na área. Foram capturados apenas 16 exemplares em dois de sete municípios, embora 10 deles o tivessem sido no intradomicílio (tabela 15). Este anofelíneo é assinantrópico ou, pelo menos, hemi-sinantrópico ^{127, 128, 129, 130, 275, 284, 288}, podendo, inclusive, fazer o repasto durante o dia ^{124, 271}, mas, onde atua como vetor, espera-se que esteja presente no ambiente antrópico. O *A. triannulatus s. l.* é um anofelíneo mais freqüente nos meses quentes ²⁵² que pode apresentar hábitos diurnos ^{264, 296}. Freqüenta as moradias ^{264, 267, 280, 286, 291, 299}, já foi experimentalmente infectado com *P. vivax* e *P. falciparum* ^{262, 263} e encontrado naturalmente infectado pelas duas espécies ^{10, 50, 51, 52, 254, 258, 259, 260}, tendo sido incriminado na cadeia de transmissão ^{50, 51, 52, 268, 312, 313, 314}. Foi, ainda, considerado suspeito de ser vetor de malária símia, embora a evidência fosse circunstancial ³¹⁵. Na área de estudo, entretanto, sua densidade foi baixa.

Dois estudos posteriores ao nosso, realizados no município de Santa Tereza, puderam definir melhor as características da fauna anofélica local. Rodrigues ³¹⁶ capturou 378 espécimes em copa de árvore na floresta, no solo, no mesmo ambiente, e no peridomicílio humano, acrescentando três espécies à lista das que já havíamos identificado, o *A. mediopunctatus*, o *A. oswaldoi s. l.* e o *Anopheles punctimacula*. A maior diversidade de espécies foi encontrada no peridomicílio e o *A. cruzii* foi capturado apenas no interior da floresta, sendo acentuadamente acrodendrofílico, uma vez que 90,8% dos espécimes foram capturados na copa de árvore.

O segundo estudo, em fase final, resultou na captura de 2.290 espécimes ao longo de dois anos, em quatro locais distintos: interior da floresta (na copa da árvore e no solo), margem da floresta (também na copa e no solo), campo aberto (extradomicílio) e peridomicílio (Helder R. Rezende, dados não publicados). As espécies foram as mesmas identificadas no presente estudo, com o acréscimo do *A. mediopunctatus*. Mais uma vez ficou clara a acrodendrofilia do *A. cruzii*. No interior da floresta, a razão entre espécimes capturados na copa e no solo foi de 799/4, enquanto na margem foi de 142/29. Fora da floresta, apenas oito espécimes de *A. cruzii* foram capturados no peridomicílio e dois no extradomicílio. Chama a atenção o fato de que, com exceção do *A. cruzii*, as densidades dos anofelíneos foram maiores no extradomicílio do que no peridomicílio. A PCR para a detecção de DNA de *Plasmodium* realizada nestes espécimes foi positiva para o *P. vivax* no tórax de *A. cruzii*, *A. strodei*, *A. parvus*, *A. lutzi* e *A. galvaoi*, e no abdome de *A. albitarsis s. l.*, *A. strodei*, *A. lutzi*, *A. galvaoi* e *A. parvus*. Ainda, no referido estudo, foi possível observar a presença de *A. lutzi*, *A. albitarsis s. l.*, *A. evansae* e *A. strodei* em todos os ambientes, sendo a menor variação nas densidades observada para o *A. lutzi* (Helder R. Rezende, dados não publicados).

Nossos resultados, quanto à diversidade e à distribuição das várias espécies de anofelíneos, são substancialmente diferentes daqueles de outros estudos realizados em áreas endêmicas de malária do sistema de Mata Atlântica. Curado¹³³, em sua Tese de doutorado, capturou 794 espécimes no PETAR e 179 em Intervalles, em ambientes variados, inclusive no interior da floresta e no peridomicílio. O *A. cruzii* representou 80% dos espécimes do PETAR e 75% daqueles de Intervalles. De resto, nove outras espécies, com baixas densidades, foram identificadas, mas apenas cinco

eram semelhantes às identificadas no presente estudo: *A. strodei*, *A. evansae*, *A. lutzi*, *A. galvaoi* e *A. triannulatus s. l.* Azevedo ¹³⁵, na localidade de Rio Bonito, estado do Rio de Janeiro, entre 295 anofelíneos capturados, identificou apenas três espécies, correspondendo 98% dos espécimes ao *A. cruzii*. Estes resultados são compatíveis com uma fauna anofélica mais característica de ambientes pouco alterados pelo homem, revelando maior possibilidade de contato do *A. cruzii* com o mesmo.

Existem dois possíveis cenários em que a cadeia de transmissão da malária autóctone do Espírito Santo pode estar ocorrendo. Em um primeiro cenário, a transmissão seria inteiramente inter-humana, mediada por anofelíneos do subgênero *Nyssorhynchus* presentes no extradomicílio e peridomicílio. Neste cenário, o predomínio do sexo masculino seria justificado pela transmissão essencialmente extradomiciliar, sendo os homens mais expostos a picadas infectantes. Este modelo de transmissão justificaria o alto percentual de moradores positivos para anticorpos contra antígenos eritrocitários, na técnica de IFI, e a presença de indivíduos assintomáticos. Existem, porém, dois obstáculos ao reconhecimento da validade desta hipótese. Em primeiro lugar, falta um vetor de reconhecida competência e capacidade, embora vetores de ordem secundária estejam presentes. Em segundo lugar, a distância espacial e temporal entre os casos detectados não é compatível nem com o raio de vôo reconhecido para estes anofelíneos, nem com o período de incubação usual da doença. A presença de um reservatório assintomático suficientemente amplo para garantir uma fonte infectante para os vetores também não foi comprovada.

Entretanto, existe uma possibilidade na qual este cenário poderia encontrar compatibilidade. Se os períodos de incubação nos hospedeiros humanos fossem excepcionalmente longos, como aqueles observados para a malária por *P. vivax* na Coreia do Sul ^{8, 317} ou entre os viajantes que retornam de áreas endêmicas no Reino Unido ³¹⁸, e os períodos de incubação extrínsecos, ou seja, ocorridos no vetor anofelíneo, fossem também longos, então a transmissão inter-humana poderia ser justificada. De fato, períodos de incubação longos fazem parte das propriedades intrínsecas do *P. vivax*. Aparentemente, em proporções variadas, todas as cepas de *P. vivax* produzem dois tipos de esporozoítos, um que induz curtos períodos de incubação (tipo I) e outro que permanece latente ou se desenvolve lentamente para dar origem a períodos de incubação longos (tipo II) ³¹⁹. O último tipo predomina em cepas de regiões temperadas, mas está presente, em menor quantidade, mesmo nas cepas de regiões tropicais ³¹⁹. Imagina-se que as recaídas de *P. vivax* são, na verdade, o resultado de parasitemias retardadas surgindo a partir de esporozoítos do tipo II ³¹⁹. Da mesma forma, períodos de incubação extrínsecos mais longos também são possíveis em temperaturas mais baixas ¹²⁵ e em vetores de menor competência, como o *A. evansae* e o *A. triannulatus s. l.* ²⁶².

Em um segundo cenário, a malária residual do Espírito Santo estaria sendo mantida a partir de um reservatório símio, configurando-se como uma zoonose. O predomínio absoluto do gênero masculino seria justificado porque estes, embora neguem, estariam adentrando a mata por diversas razões e se expondo a picadas infectantes do *A. cruzii*. Isto justificaria as baixas parasitemias observadas, decorrentes de infecção por parasitas mal adaptados a um hospedeiro diferente do habitual. Também dois obstáculos se antepõem à validade desta hipótese. Em

primeiro lugar, neste cenário, a infecção dos seres humanos seria um evento totalmente acidental, não justificando o alto percentual de moradores positivos para anticorpos contra antígenos eritrocitários de *Plasmodium*. Em segundo lugar, a acrodendrofilia acentuada do *A. cruzii* torna uma exposição desta natureza improvável. Apesar de, às vezes, fazer o repasto durante o dia ^{124, 271}, o *A. cruzii* é predominantemente crepuscular vespertino ³²⁰. Desta forma, desprovidos da vantagem de atacar um hospedeiro vulnerável, como aquele que está dormindo, precisam estar presentes em alta densidade para efetuar um número de picadas suficientemente grande para tornar a transmissão provável, embora tal evento não seja completamente impossível em baixas densidades ³²⁰.

Obviamente, estes dois cenários não são mutuamente excludentes. É possível que a malária residual do Espírito Santo esteja sendo transmitida de ambas as maneiras, tendo origem no reservatório símio e sendo ampliada por transmissão inter-humana garantida por vetores secundários do subgênero *Nyssorhynchus*.

Um estudo de natureza descritiva, como este, é insuficiente para responder a todas estas questões. Mais estudos são necessários, os quais devem incluir a investigação da malária símia, a qual já está em andamento, a realização de um estudo observacional analítico, provavelmente do tipo caso-controle, para avaliar melhor os possíveis fatores de risco, e um inquérito completo em uma área de características ambientais semelhantes, mas desprovida de malária, nele incluído um levantamento da fauna anofélica. Talvez, porém, a resposta final só possa ser obtida a partir de um estudo de intervenção, do tipo ensaio de comunidade, no qual, respeitando-se os protocolos éticos, moradores expostos positivos na técnica de IFI, a partir de um limiar de reatividade predeterminado, seriam tratados em um local,

enquanto, em outro, tal tratamento não seria realizado. A malária residual do sistema de Mata Atlântica é endemia de natureza extremamente complexa, a qual já vem sendo investigada em outros locais há vários anos, muito tendo que ser percorrido até que todos os seus aspectos sejam revelados. Felizmente, porém, um pouco mais vai sendo revelado a cada estudo que se realiza neste processo de investigação.

Após o fim do nosso estudo, casos de malária autóctone nas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo continuaram a ser registrados, atingindo o total excepcionalmente alto de 44 casos para o ano de 2005. Talvez este aumento tenha ocorrido em função da maior pluviosidade no ano em questão ou, talvez, nosso estudo tenha influído indiretamente na sensibilidade do sistema de detecção de casos. Qualquer que seja o motivo, não parece haver uma tendência crescente, uma vez que, embora os dados referentes ao ano de 2006 ainda não tenham sido definitivamente processados, o número de casos não deve exceder o total de trinta no mesmo.

Diante da magnitude do problema da malária na região Amazônica, a questão da malária extra-Amazônica residual pode parecer destituída de importância. Entretanto, se observarmos esta mesma magnitude sob um ponto de vista mais global, mesmo a malária Amazônica tem pouca importância diante das dimensões tomadas pela doença na África. Com efeito, apesar da expansão geográfica recente da malária no mundo, as várias décadas do século XX assistiram a uma redução dramática da morbidade e da mortalidade causadas pela doença, exceto na África²⁰⁶. Por exemplo, o número de óbitos no mundo inteiro, excetuando-se a África, conseqüentes à malária, era de quase três milhões em 1900, tendo sido reduzido para apenas 69.000 em 1997²⁰⁶. Parece claro que as condições sociais e econômicas, bem como os avanços tecnológicos, têm relação com ambas as situações, tanto o declínio

da morbi-mortalidade em nível mundial quanto a manutenção de sua magnitude na África. Contudo, sem dúvida, os ganhos obtidos em relação à malária devem ser creditados aos inúmeros cientistas e técnicos que se dedicaram com afinco ao seu combate. Para estes homens e mulheres, nenhum índice de letalidade era pequeno demais e nenhuma situação de transmissão era insignificante demais. Eles conseguiram êxito porque abordaram o problema da maneira como ele deve continuar sendo abordado. A malária é um evento mórbido que compromete o equilíbrio, a sustentabilidade e o desenvolvimento das populações e, portanto, nenhum esforço deve ser considerado desproporcional na busca de seu pleno controle.

7 Conclusões:

7.1 A malária autóctone do Espírito Santo é causada por duas espécies de protozoários do gênero *Plamodium*, o *P. vivax* e o *P. malariae*, conforme demonstrado pela avaliação morfológica dos parasitas nas gotas espessas e esfregaços, pela PCR Multiplex e pela reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos contra antígenos eritrocitários de parasitas da malária nos pacientes acometidos.

7.2 É uma doença que se apresenta com sinais e sintomas exuberantes e de longa duração, entre os quais destacam-se a febre, na maioria das vezes a cada 48 horas, a cefaléia e os calafrios. Porém, é destituída de gravidade.

7.3 Acomete os municípios da região montanhosa do estado, com o maior número de casos sendo registrados em Santa Tereza, Domingos Martins e Santa Maria de Jetibá. Estes municípios ocupam a maior área de abrangência da endemia. Os pacientes acometidos são, em sua maioria, homens jovens, agricultores ou estudantes, com um contato permanente ou prolongado, ocupacional ou não, com o ambiente rural. Desta forma, a transmissão parece ocorrer essencialmente no ambiente extra-domiciliar.

7.4 Foi evidenciada a circulação de todas as variantes do *P. vivax* e do *P. malariae* entre os pacientes e na população exposta, com base na técnica de ELISA para a detecção de anticorpos contra peptídeos sintéticos correspondentes à CSP dos

referidos parasitas. A frequência de resultados positivos foi, para os pacientes, de 44% para o *P. vivax* clássico (VK 210), 22% para a variante VK 247, 20% para o *P. vivax*-like e 20% para o *P. malariae*. Na população exposta, as frequências foram de 25,4% para o *P. vivax* clássico, 6,3% para a VK 247, 10,7% para o *P. vivax*-like e 15,1% para o *P. malariae*. Entre os pacientes, 50% foram negativos para todos os peptídeos sintéticos testados e, assim como para a população exposta, vários indivíduos foram positivos para anticorpos contra mais de um peptídeo simultaneamente.

7.5 Foram capturados 785 espécimes de anofelíneos no peridomicílio dos pacientes com malária, sendo encontradas as seguintes espécies: *A. (N.) evansae* (29,7%), *A. (N.) strodei* (24,6%), *A. (N.) lutzi* (19,9%), *A. (N.) argyritarsis* (11,2%), *A. (N.) albitarsis s. l.* (3,4%), *A. (N.) galvaoi* (2,8%), *A. (K.) cruzii* (2%), *A. (A.) minor* (1%), *A. (N.) parvus* (0,5%) e *A. (N.) triannulatus s. l.* (0,5%), permanecendo 34 espécimes (4,3%) sem identificação em nível de espécie.

7.6 A soro-prevalência na população exposta, conforme foi determinado pela reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos contra estágios eritrocitários de *Plasmodium*, foi de 15,8% (40/253) para anticorpos da classe IgM contra *P. malariae*, 44,6% (113/253) para anticorpos da classe IgG contra *P. malariae*, 6,2% (105/1.701) para anticorpos da classe IgM contra *P. vivax* e 37,7% (641/1.701) para anticorpos da classe IgG contra *P. vivax*.

7.7 Foram identificados, pela PCR Multiplex, 23 indivíduos, dentre os 1.527 habitantes testados (1,5%), com presença de DNA de *P. vivax* na corrente sangüínea, assim como 15 (0,9%) com DNA de *P. malariae*, 9 (0,5%) com DNA de *P. falciparum* e um indivíduo com presença simultânea de DNA de *P. malariae* e *P. falciparum*. A partir destes resultados, as dez amostras positivas para *P. falciparum* na PCR Multiplex e 182 amostras escolhidas aleatoriamente entre as restantes foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos contra antígenos eritrocitários do mesmo parasita, sendo obtido resultado positivo em 15,6% (30/192) e 14,6% (28/192), respectivamente para anticorpos das classes IgM e IgG.

7.8 ‘Em cinco símios da região submetidos a coleta de sangue para pesquisa de *Plasmodium*, o *P. malariae/brasilianum* pôde ser identificado em um pela técnica de PCR Multiplex e, em outro, por esta mesma técnica e pelas características morfológicas dos parasitas presentes no esfregaço fino.

7.9 Dois cenários podem explicar a transmissão da malária autóctone do Espírito Santo. Em um primeiro cenário, a malária seria de transmissão essencialmente inter-humana, mediada por vetores de magnitude secundária pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus*. Em um segundo cenário, a malária seria proveniente do reservatório símio, mediada pelo *A. cruzii* ao praticar o repasto em seres humanos que adentram o ambiente florestal. Os dois cenários não são mutuamente excludentes.

8 Anexos:

Anexo 1

Termo de Consentimento pós-informação para Inclusão de Pacientes

Título do estudo: Caracterização Epidemiológica de Malária de Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo.

1) Objetivos do Estudo:

Você tem sintomas sugestivos de malária, uma doença infecciosa parasitária transmitida por mosquitos e que causa destruição dos glóbulos vermelhos do sangue, manifestando-se por febre, calafrios e outros sintomas. A malária é uma doença bastante freqüente na região Amazônica, mas praticamente inexistente em outras áreas do país. Fora da região Amazônica, os casos de malária geralmente ocorrem em pessoas que viajaram para aquela região recentemente, entretanto existem alguns lugares em que a doença pode ocorrer devido a transmissão local. Recentemente têm sido observados casos relacionados a áreas de mata Atlântica em localidades montanhosas de vários estados. Pouco se sabe a respeito destes casos. Não foi determinado, por exemplo, sua freqüência, a espécie do mosquito envolvido na transmissão, a espécie do parasita e os fatores de risco envolvidos na transmissão da doença.

O presente estudo tem por objetivo determinar as características biológicas e epidemiológicas desta doença para, desta forma, definir ações que possam resultar na diminuição do número de casos ou na interrupção da transmissão.

2) Termo de Consentimento:

Se você é suspeito de ter malária, serão colhidas gotas de sangue da ponta do seu dedo para a realização de teste diagnóstico. Se a malária for confirmada, você receberá tratamento pelo período de sete dias. As medicações serão administradas uma vez por dia sob supervisão da equipe da Secretaria Estadual de Saúde. Serão feitos exames posteriores pela equipe da Secretaria para verificar se você foi curado, periodicamente, ao longo de seis meses.

O presente termo de consentimento traz informações sobre este estudo que serão discutidas com você agora e em outras ocasiões ao longo do mesmo. Se você concordar em participar, pediremos que assine o presente termo. Você receberá uma cópia deste termo para guardar.

Se você decidir participar do estudo, faremos uma série de perguntas sobre seus dados pessoais, como nome, idade, estado civil, profissão e naturalidade. Também serão feitas perguntas a respeito de informações relevantes para as características da sua malária, como zona residencial em que você vive, seus deslocamentos, há quanto tempo iniciaram-se os sintomas, quais são os sintomas e de quanto em quanto tempo a febre aparece. Será solicitado que você forneça seu endereço, com ponto de referência, e número do telefone.

Para que você participe do estudo, será necessário colher pequena quantidade de sangue de sua veia (cerca de uma colher de sopa). Não haverá, entretanto, nenhuma diferença em relação ao tipo e duração do tratamento a que você será submetido.

Se você concordar em participar, pediremos que você nos indique exatamente o local em que você possivelmente adquiriu a malária, para que possamos ir lá obter mais informações sobre a doença.

3) Benefícios e Riscos:

Caso você decida participar do estudo, não haverá benefícios diretos para você, mas você estará contribuindo para uma melhor compreensão da malária que é transmitida no Espírito Santo e sobre possíveis estratégias para o seu controle.

O risco de sua participação no estudo é de discreta dor no local da punção venosa e a formação possível de um hematoma no referido local.

4) Procedimentos Alternativos:

Sua participação no estudo é voluntária. Caso você se recuse a participar, você receberá tratamento para a malária da mesma forma que receberia caso estivesse no estudo. Sua recusa em participar do presente estudo não resultará em perdas para você ou na impossibilidade de você vir a participar de outros estudos no futuro.

5) Precauções:

Seu tratamento será supervisionado pela equipe da Secretaria Estadual de Saúde para que possa ser assegurada a eficácia do mesmo. Se você tiver qualquer reação às drogas administradas, tomaremos providências imediatas para tratar a mesma.

A coleta de seu sangue será feita utilizando-se material descartável.

6) Razões para Exclusão do Estudo sem o seu Consentimento:

Não existem razões para que você seja excluído do estudo sem o seu consentimento.

7) Confidencialidade:

As informações obtidas de você são de natureza confidencial e não serão divulgadas. Apenas os investigadores envolvidos no estudo, os membros da Comissão de Ética do Centro Biomédico, as autoridades da Secretaria Estadual de Saúde e do Ministério da Saúde e investigadores da Universidade de São Paulo terão acesso às informações obtidas de você.

O sangue que será coletado de você, será identificado de forma a proteger a confidencialidade das informações, de acordo com a lei no Brasil.

8) Problemas ou Perguntas:

Caso você tenha qualquer dúvida sobre os objetivos do estudo e sobre sua participação no mesmo, você poderá perguntar agora ou em qualquer momento que julgar necessário. Você poderá dirigir-se ao Dr. Crispim Cerutti Junior (tel.: 335-7225 ou 9941-3195) ou a qualquer membro da equipe de investigação.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante do estudo, você poderá dirigir-se ao Dr. Paulo Merçon de Vargas, presidente da Comissão de Ética do Centro Biomédico (tel. 335-7210).

9) Declaração de Consentimento:

Eu compreendo o objetivo deste estudo e o que devo fazer para permanecer no mesmo. Também compreendo quais são os riscos e os benefícios para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Nome do voluntário

Assinatura do voluntário

Data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

Data**Declaração do Investigador:**

Expliquei o objetivo do estudo ao voluntário. Tenho pleno conhecimento de que ele/ela entendeu o objetivo, os procedimentos, os riscos e os benefícios da participação no estudo.

Nome do investigador

Assinatura do investigador

Data.

Anexo 2**Ficha de Avaliação Clínica dos Pacientes com Malária Autóctone****Data:****1) Nome:****2) Iniciais:****3) Número no estudo:****4) Idade:****5) Sexo:****6) Estado Civil:****7) Profissão:****8) Atividades de trabalho exercidas nos últimos 30 dias:****9) Naturalidade:****10) Zona de moradia (rural ou urbana):****11) Residências anteriores (locais, período):**

12) Outras atividades cotidianas (cortar lenha, lavar roupa, buscar água, etc...):

Lazer

13) Deslocamentos (presença de malária nos locais?):

14) Teve contato com suspeitos de malária no último ano? Sim (1). Não (2).

Onde? _____

15) Tempo de duração dos sintomas até o diagnóstico:

16) Manifestações Clínicas:

____ Febre:

____ Calafrios:

____ Cefaléia:

____ Artralgias:

____ Mialgias:

____ Lombalgia:

____ Fraqueza:

____ Tosse:

____ Dor Abdominal:

____ Tontura:

____ Sudorese:

____ Dor óssea:

____ Vômitos:

____ Anorexia:

____ Outros:

17) Padrão de ocorrência da febre (episódica ou não): Período:

18) Esteve doente nos últimos 6 meses? Sim (1) Não (2). Se sim, onde e qual a doença?

19) Doou sangue nos últimos seis meses? Sim (1) Não (2). Se sim, onde?

20) Recebeu sangue nos últimos seis meses? Sim (1) Não (2). Se sim, onde?

21) Resultado da gota espessa:

22) Provável local de infecção:

23) Local de realização do diagnóstico:

24) Tamanho do baço:

25) Presença de anofelinos no peridomicílio:

26) Episódios anteriores de malária:

27) Endereço:

28) Telefone:

Anexo 3

Termo de Consentimento pós-informação para Inquérito Sorológico da População Exposta

Título do estudo: Caracterização Epidemiológica de Malária de Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo.

1) Objetivos do Estudo:

Você reside em uma área em que ocorrem casos de malária, uma doença infecciosa parasitária transmitida por mosquitos e que causa destruição dos glóbulos vermelhos do sangue, manifestando-se por febre, calafrios e outros sintomas. A malária é uma doença bastante freqüente na região Amazônica, mas praticamente inexistente em outras áreas do país. Fora da região Amazônica, os casos de malária geralmente ocorrem em pessoas que viajaram para aquela região recentemente, entretanto existem alguns lugares em que a doença pode ocorrer devido a transmissão local. Recentemente têm sido observados casos relacionados a áreas de mata Atlântica em localidades montanhosas de vários estados. Pouco se sabe a respeito destes casos. Não foi determinado, por exemplo, sua freqüência, a espécie do mosquito envolvido na transmissão, a espécie do parasita e os fatores de risco envolvidos na transmissão da doença.

O presente estudo tem por objetivo determinar as características biológicas e epidemiológicas desta doença para, desta forma, definir ações que possam resultar na diminuição do número de casos ou na interrupção da transmissão.

2) Termo de Consentimento:

Pelo fato de você viver em região em que ocorrem casos de malária, é possível que você já tenha sido infectado no passado, mesmo sem ter tido sintomas. Se isto aconteceu, seu organismo desenvolveu anticorpos contra a doença. Estes anticorpos não têm força suficiente para impedir que você seja infectado de novo, mas são uma marca do seu contato com o parasita da malária.

Conhecer o número de pessoas com anticorpos contra a malária é uma boa maneira de medir o tamanho do problema em uma área de transmissão. Isto ajuda no estabelecimento de estratégias de controle.

Para conhecer o número de pessoas com anticorpos, é preciso colher sangue de um certo número daqueles que vivem na área de transmissão para medir a presença de anticorpos no mesmo.

O presente termo de consentimento traz informações sobre este estudo que serão discutidas com você agora e em outras ocasiões ao longo do mesmo. Se

você concordar em participar, pediremos que assine o presente termo. Você receberá uma cópia deste termo para guardar.

Se você concordar em participar do estudo, colheremos cerca de uma colher de sobremesa de seu sangue para pesquisa de anticorpos.

3) Benefícios e Riscos:

Caso você decida participar do estudo, não haverá benefícios diretos para você, mas você estará contribuindo para uma melhor compreensão da malária que é transmitida no Espírito Santo e sobre possíveis estratégias para o seu controle.

O risco de sua participação no estudo é dor e possível formação de um hematoma no local da coleta do sangue.

4) Procedimentos Alternativos:

Sua participação no estudo é voluntária. Sua recusa em participar não resultará em perdas para você ou na impossibilidade de você vir a participar de outros estudos no futuro.

5) Precauções:

A coleta de seu sangue será feita utilizando-se material descartável.

6) Razões para Exclusão do Estudo sem o seu Consentimento:

Não existem razões para que você seja excluído do estudo sem o seu consentimento.

7) Confidencialidade:

As informações obtidas de você são de natureza confidencial e não serão divulgadas. Apenas os investigadores envolvidos no estudo, os membros da Comissão de Ética do Centro Biomédico, as autoridades da Secretaria Estadual de Saúde e do Ministério da Saúde e investigadores da Universidade de São Paulo terão acesso às informações obtidas de você.

O sangue que será coletado de você, será identificado de forma a proteger a confidencialidade das informações, de acordo com a lei no Brasil.

8) Problemas ou Perguntas:

Caso você tenha qualquer dúvida sobre os objetivos do estudo e sobre sua participação no mesmo, você poderá perguntar agora ou em qualquer momento que julgar necessário. Você poderá dirigir-se ao Dr. Crispim Cerutti Junior (tel.: 335-7225 ou 9941-3195) ou a qualquer membro da equipe de investigação.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante do estudo, você poderá dirigir-se ao Dr. Paulo Merçon de Vargas, presidente da Comissão de Ética do Centro Biomédico (tel. 335-7210).

9) Declaração de Consentimento:

Eu compreendo o objetivo deste estudo e o que devo fazer para participar do mesmo. Também compreendo quais são os riscos e os benefícios para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Nome do voluntário

Assinatura do voluntário

Data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

Data

Declaração do Investigador:

Expliquei o objetivo do estudo ao voluntário. Tenho pleno conhecimento de que ele/ela entendeu o objetivo, os procedimentos, os riscos e os benefícios da participação no estudo.

Nome do investigador

Assinatura do investigador**Data:** _____

Anexo 4

Protocolo para Extração de DNA Genômico

III. Protocols for Genomic DNA Isolation

We have tested the purification of genomic DNA from fresh whole blood collected in EDTA-, heparin- and citrate-anticoagulant tubes, and have detected no adverse effects upon subsequent manipulations of the DNA, including PCR (3). Anticoagulant blood samples may be stored at 2–8°C for up to two months, but DNA yield will be reduced with length of storage.

The protocol in Section III.A has been designed and tested for blood samples up to 3ml in volume. The protocol in Section III.B has been designed and tested for blood samples up to 10ml in volume. The yield of genomic DNA will vary depending on the quantity of white blood cells present. Frozen blood may be used in the following protocols, but yield may be lower than that obtained using fresh blood, and additional Cell Lysis Solution may be required.

Caution: When handling blood samples (Sections III.A, B and C), follow recommended procedures at your institution for biohazardous materials or see reference 2.

A. Isolation of Genomic DNA from Whole Blood (300µl or 3ml Sample Volume)

Materials to Be Supplied by the User

- sterile 1.5ml microcentrifuge tubes (for 300µl blood samples)
- sterile 15ml centrifuge tubes (for 3ml blood samples)
- water bath, 37°C
- isopropanol, room temperature
- 70% ethanol, room temperature
- water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)

1. For 300µl Sample Volume: Add 900µl of Cell Lysis Solution to a sterile 1.5ml microcentrifuge tube.

For 3ml Sample Volume: Add 9.0ml of Cell Lysis Solution to a sterile 15ml centrifuge tube.

2. Gently rock the tube of blood until thoroughly mixed; then transfer blood to the tube containing the Cell Lysis Solution. Invert the tube 5–6 times to mix.
3. Incubate the mixture for 10 minutes at room temperature (invert 2–3 times once during the incubation) to lyse the red blood cells. Centrifuge at 13,000–16,000 $\times g$ for 20 seconds at room temperature for 300µl sample. Centrifuge at 2,000 $\times g$ for 10 minutes at room temperature for 3ml sample.
4. Remove and discard as much supernatant as possible without disturbing the visible white pellet. Approximately 10–20µl of residual liquid will remain in the 1.5ml tube (300µl sample). Approximately 50–100µl of residual liquid will remain in the 15ml tube (3ml sample).

If blood sample has been frozen, repeat Steps 1–4 until pellet is white. There may be some loss of DNA from frozen samples.

Note: Some red blood cells or cell debris may be visible along with the white blood cells. If the pellet appears to contain only red blood cells, add an additional aliquot of Cell Lysis Solution after removing the supernatant above the cell pellet, and then repeat Steps 3–4.

5. Vortex the tube vigorously until the white blood cells are resuspended (10–15 seconds).

IMPORTANT!

...Blood must be collected in EDTA-, heparin- or citrate-anticoagulant tubes to prevent clotting.

Completely resuspend the white blood cells to obtain efficient cell lysis.

6. Add Nuclei Lysis Solution (300 μ l for 300 μ l sample volume; 3.0ml for 3ml sample volume) to the tube containing the resuspended cells. Pipet the solution 5–6 times to lyse the white blood cells. The solution should become very viscous. If clumps of cells are visible after mixing, incubate the solution at 37°C until the clumps are disrupted. If the clumps are still visible after 1 hour, add additional Nuclei Lysis Solution (100 μ l for 300 μ l sample volume; 1.0ml for 3ml sample volume) and repeat the incubation.
7. **Optional:** Add RNase Solution (1.5 μ l for 300 μ l sample volume; 15 μ l for 3ml sample volume) to the nuclear lysate and mix the sample by inverting the tube 2–5 times. Incubate the mixture at 37°C for 15 minutes, and then cool to room temperature.
8. Add Protein Precipitation Solution (100 μ l for 300 μ l sample volume; 1.0ml for 3ml sample volume; see Note in margin) to the nuclear lysate and vortex vigorously for 10–20 seconds. Small protein clumps may be visible after vortexing.
9. Centrifuge at 13,000–16,000 $\times g$ for 3 minutes at room temperature for 300 μ l sample volume. Centrifuge at 2,000 $\times g$ for 10 minutes at room temperature for 3ml sample volume.
A dark brown protein pellet should be visible. If no pellet is observed, refer to Section IV.
10. For 300 μ l sample volume, transfer the supernatant to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 300 μ l of room temperature isopropanol. For 3ml sample volume, transfer the supernatant to a 15ml centrifuge tube containing 3ml room temperature isopropanol.
11. Gently mix the solution by inversion until the white thread-like strands of DNA form a visible mass.
12. Centrifuge at 13,000–16,000 $\times g$ for 1 minute at room temperature for 300 μ l sample. Centrifuge at 2,000 $\times g$ for 1 minute at room temperature for 3ml sample. The DNA will be visible as a small white pellet.
13. Decant the supernatant and add one sample volume of room temperature 70% ethanol to the DNA. Gently invert the tube several times to wash the DNA pellet and the sides of the microcentrifuge tube. Centrifuge as in Step 12.
14. Carefully aspirate the ethanol using either a drawn Pasteur pipette or a sequencing pipette tip. The DNA pellet is very loose at this point and care must be used to avoid aspirating the pellet into the pipette. Invert the tube on clean absorbent paper and air-dry the pellet for 10–15 minutes.
15. Add DNA Rehydration Solution (100 μ l for 300 μ l sample volume; 250 μ l for 3ml sample volume) to the tube and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
16. Store the DNA at 2–8°C.

Note: If additional Nuclei Lysis Solution was added in **Step 6**, add a total of 130 μ l Protein Precipitation Solution for 300 μ l sample volume and 1.3ml Protein Precipitation Solution for 3ml sample volume at **Step 8**.

Note: At **Step 10**, some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.

Anexo 5

Termo de Consentimento pós-informação

Título do Estudo: Caracterização Epidemiológica da Malária de Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo.

1. Objetivos do Estudo:

O Espírito Santo tem transmissão local de malária, com um total de 10 a 30 casos anuais que ocorrem em municípios da região montanhosa, em um total de nove: Santa Tereza, Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina, Domingos Martins, Alfredo Chaves, Vargem Alta, Marechal Floriano, São Roque do Canaã e Viana. Estes casos têm sido investigados desde 2001. Neste período, a população residente na área de transmissão foi submetida a coleta de sangue para realização de diversos exames, inclusive a detecção de anticorpos contra os parasitas da malária.

Para que possamos estar seguros de que a positividade para estes anticorpos representa realmente contato prévio com os parasitas da malária e não um outro fator estranho, achamos necessário fazer o exame também em uma população não sujeita ao risco de malária. Como é de interesse das autoridades de saúde conhecer a situação de contato das populações de área rural com o vírus da febre amarela, resolvemos combinar as duas investigações. Por estes motivos, viemos a Alegre para solicitar sua colaboração mediante a permissão para colher pequena quantidade de sangue de sua veia para realizar pesquisa de anticorpos contra os dois microorganismos, o vírus da febre amarela e o parasita da malária.

2. Termo de Consentimento:

Eu compreendo o objetivo deste estudo. Sou voluntário para que seja colhida pequena quantidade de sangue de minha veia para detecção de anticorpos contra o parasita da malária e o vírus da febre amarela. Sei que não haverá benefício direto para mim, mas que eu estarei ajudando a compreender a transmissão da malária e a extensão do risco de febre amarela no estado. Os riscos para mim são pequena dor no local da coleta e a possibilidade de que se forme um hematoma no local. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Nome: _____.

Data: _____.

Assinatura: _____.

Testemunha: _____.

Assinatura: _____.

Anexo 6

Distribuição dos casos cadastrados de malária autóctone por provável local de infecção, por ano, para os municípios de Santa Tereza, Domingos Martins, Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina, Alfredo Chaves, São Roque do Canaã e Vargem Alta.

Município	Local	Ano			
		2001	2002	2003	2004
Santa Tereza					
	Valsugana Velha		3	1	3
	Encantado			4	2
	Tabocas	1			
	CINDACTA	1	1		
	Alto Goiapabuçu	1			
	Vale do Canaã		1		
	Santa Lúcia		1		
	Alto Lombardia		1		
	Várzea Alegre			1	
	Córrego Rio Novo				1
	Cabeceira do Rio Saltinho				1
Domingos Martins					
	Melgaço		1	2	
	Melgacinho	2			
	Aracê		2		2
	Rio Ponte		1		
	Biriricas			1	

continua

Distribuição dos casos cadastrados de malária autóctone por provável local de infecção, por ano, para os municípios de Santa Tereza, Domingos Martins, Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina, Alfredo Chaves, São Roque do Canaã e Vargem Alta (continuação).

Município	Local	Ano			
		2001	2002	2003	2004
Domingos Martins	Santa Luzia			1	
	Soído de Cima			1	
	Soído de Baixo				1
	São Bento do Chapéu				1
Santa Maria de Jetibá	Rio Novo		2	2	
	Rio das Farinhas			1	
	Caramuru	1			
	Alto Rio Lamêgo e Alto Tijuco Preto		1		
	São Sebastião de Belém e Rio das Pedras			1	
	Cabeceira do Rio Bonito			1	
	Rio Bonito			1	
Santa Leopoldina	Rio do Meio			2	
	Meia Légua			1	
	Rio Veado	1			
Alfredo Chaves	São Bento de Urânia		1		
	Iritimirim			1	

continua

Distribuição dos casos cadastrados de malária autóctone por provável local de infecção, por ano, para os municípios de Santa Tereza, Domingos Martins, Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina, Alfredo Chaves, São Roque do Canaã e Vargem Alta (conclusão).

Município	Local	Ano			
		2001	2002	2003	2004
São Roque do Canaã					
	Tancredo		1		
Vargem Alta					
	Monte Verde			1	
	BR 262-Km 53			1	
	Barra do Rio Fundo			1	

Anexo 7

Resultado de PCR e IFI para 50 pacientes com Malária Autóctone do Espírito Santo cadastrados entre abril de 2001 e março de 2004.

Nº do Paciente	IFI				PCR
	IgM <i>P. malariae</i>	IgG <i>P. malariae</i>	IgM <i>P. vivax</i>	IgG <i>P. vivax</i>	
14	NR	NR	1:2 560	1:5 120	NR
15	1:320	1:320	1:5 120	1:5 120	Pv
16	NR	NR	1:320	1:1 280	Pv
17	1:160	1:320	1:40	1:2 560	Pv
18	NR	NR	1:320	1:2 560	Pv
19	NR	NR	1:80	1:640	Pv
20	NR	NR	1:160	1:640	Pv
21	Neg.	1:1 280	1:320	1:10 240	Pv
22	NR	NR	1:5 120	1:5 120	Pv
24	NR	NR	1:2 560	1:5 120	Pv
25	NR	NR	1:2 560	1:10 240	Pv
26	NR	NR	1:2 560	1:10 240	Pv
27	NR	NR	1:1 280	1:10 240	Pv
28	NR	NR	1:2 560	1:10 240	Pv
29	1:640	1:640	1:640	1:10 240	Pv
30	NR	NR	1:1 280	1:10 240	Pv
31	NR	NR	1:2 560	1:10 240	Pv
32	NR	NR	1:2 560	1:10 240	Pv
33	NR	NR	1:640	1:5 120	Pv
34	NR	NR	1:1 280	1:10 240	Pv
35	NR	NR	1:1 280	1:10 240	Pv
36	NR	NR	1:2 560	1:5 120	Pv
37	NR	NR	1:2 560	1:10 240	Pv
38	NR	NR	1:2 560	1:10 240	Pv

continua

Resultado de PCR e IFI para 50 pacientes com Malária Autóctone do Espírito Santo cadastrados entre abril de 2001 e março de 2004 (conclusão).

Nº do Paciente	IFI				PCR
	IgM <i>P. malariae</i>	IgG <i>P. malariae</i>	IgM <i>P. vivax</i>	IgG <i>P. vivax</i>	
39	NR ¹	NR	1:2 560	1:5 120	Pv ¹
40	1:1 280	1:640	1:10 240	1:10 240	Pv
41	1:2 560	1:320	1:1 280	1:10 240	Pv
42	NR	NR	1:1 280	1:5 120	Pv
43	NR	NR	1:1 280	1:10 240	Pv
45	NR	NR	1:5 120	1:10 240	Pv
46	NR	NR	1:5 120	1:5 120	Pv
47	NR	NR	1:2 560	1:5 120	Pv
48	NR	NR	1:2 560	1:10 240	Pv
49	NR	NR	1:2 560	1:5 120	Pv
50	1:5 120	1:640	1:2 560	1:5 120	Pv
51	NR	NR	1:10.240	1:10.240	Neg.
52	NR	NR	1:2 560	1:5 120	Pv
53	NR	NR	1:5 120	1:2 560	Pv
54	NR	NR	1:5 120	1:10 240	Pv
55	NR	NR	1:320	1:1 280	Pv
56	NR	NR	1:320	1:10 240	Pv
57	NR	NR	1:5 120	1:1 280	Pv
58	NR	NR	1:2 560	1:2 560	Pv
59	NR	NR	1:10 240	1:10 240	NR
60	NR	NR	Neg.	Neg.	Neg.
61	NR	NR	1:1.280	1:5.120	Pv
62	NR	NR	1:640	1:5 120	Pv
63	NR	NR	1:2 560	1:5 120	Pv
64	NR	NR	1:640	1:10 240	Pm ¹
65	NR	NR	1:40	Neg.	Pv

⁽¹⁾ NR: Não Realizado Pv: *P. vivax* Pm: *P. malariae* Neg.: negativa

Anexo 8

Resultado do ELISA para detecção de anticorpos anti-CSP em 50 pacientes com Malária Autóctone do Espírito Santo cadastrados entre abril de 2001 e março de 2004.

Nº do Paciente	ELISA			
	VK 210	VK 247	<i>P. vivax-like</i>	<i>P. malariae</i>
14	+	-	+	-
15	+	-	-	+
16	-	-	-	-
17	-	+	-	+
18	+	+	+	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	+
22	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	+
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	+	-	+	-
38	+	+	+	-

continua

Resultado do ELISA para detecção de anticorpos anti-CSP em 50 pacientes com Malária Autóctone do Espírito Santo cadastrados entre abril de 2001 e março de 2004 (conclusão).

Nº do Paciente	ELISA			
	VK 210	VK 247	<i>P. vivax-like</i>	<i>P. malariae</i>
39	-	-	-	-
40	+	+	+	+
41	+	+	+	+
42	-	-	-	-
43	-	-	-	-
45	+	+	+	+
46	-	-	-	-
47	+	-	-	-
48	-	-	-	-
49	+	-	+	-
50	+	+	+	+
51	+	-	-	+
52	+	+	-	-
53	+	+	+	-
54	+	+	-	-
55	+	-	-	-
56	+	-	-	-
57	+	-	-	-
58	-	-	-	-
59	-	-	-	-
60	-	-	-	-
61	+	-	-	-
62	+	-	-	-
63	+	-	-	-
64	-	-	-	-
65	+	+	-	+

9 Referências:

- 1 – Malaria Site. All about malaria. [Homepage na Internet]. B. S. Kakkilaya 2006-2008 malariasite.com 2006-2008 © [Cited 2006 Apr 14]. Available from: <http://www.malariasite.com/malaria/WhatIsMalaria.htm>.
- 2 – Kondrashin AV. Malaria in the WHO Southeast Asia Region. *Indian J Malariol.* 1992;29: 129-60.
- 3 – Marques AC. Migrations and the dissemination of malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(Suppl II): 17-30
- 4 – Sharma VP. Re-emergence of malaria in India. *Indian J Med Res.* 1996;103:26-45.
- 5 – Talib VH. Malaria Indian scenario. *Indian J Pathol Microbiol.* 1996;39(5): 381-90.
- 6 – Kondrachine AV, Trigg PI. Global Overview of Malaria. *Indian J Med Res.* 1997;106:39-52.
- 7 – Heymann DL, Rodier GR, WHO Operational Support Team to The Global Outbreak Alert And Response Network. Hot Spots in a wired world: WHO surveillance of emerging and re-emerging infectious diseases. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(5):345-53.
- 8 – Lim CS, Kim YK, Lee KN, Kim SH, Hoffman KJ; Song K-J, Song J-W. The analysis of circumsporozoite-protein gene sequences from South Korean isolates of *Plasmodium vivax*. *Ann Trop Med Parasitol.* 2001;95(3)229-35.

- 9 – Portal da Saúde [Homepage na Internet]. Brasília: Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmissíveis. Série Histórica de Óbitos e Casos de Doenças de Notificação Compulsória no Brasil (1980-2005). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/svs/area.cfm?id_area=451.
- 10 – Tadei WP, Thatcher BD, Santos JMM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on Anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J. Trop Med Hyg.* 1998; 59(2):325-35
- 11 – Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico da Malária nº 01/2003. Brasília, 2003. *Informe*.
- 12 – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Homepage na Internet]. Brasília: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Censo Agropecuário de 1995- 1996. Espírito Santo. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/3/>
- 13 – Espírito Santo. Secretaria do Estado da Saúde do Espírito Santo. Programa Estadual de Controle da Malária. Vitória, 2004. *Informe Técnico*.
- 14 – Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT, Maloy WL, Haynes JD, Schneider I, Roberts D, Sanders GS, Reddy EP, Diggs CL, Miller LH. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1984; 225:593-99.
- 15 – Zavala F, Tam JP, Hollingdale MR, Cochrane AH, Quakyi I, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *Science*. 1985; 228: 1436-40.

- 16 – Esposito F, Lombardi S, Modiano D, Zavala F, Reeme J, Lamizana L, Coluzzi M, Nussenzweig RS. Prevalence and levels of antibodies to the Circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82:827-32.

- 17 – Webster HK, Boudreau EF, Pang L, Permpanich B, Sookto, P, Wirtz RA. Development of immunity in natural *Plasmodium falciparum* malaria: Antibodies to the falciparum sporozoite vaccine 1 antigen (R32tet32). *J Clin Microbiol.* 1987;25(6):1002-8.

- 18 – Webster HK, Brown AE, Chuenchitra C, Permpanich B, Pipithkul J. Characterization of antibodies to sporozoites in *Plasmodium falciparum* malaria and correlation with protection. *J Clin Microbiol.* 1988;26(5):923-27.

- 19 – Arnot DE, Barnwel JW, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Enea V. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and Characterization of the immunodominant epitope. *Science.* 1985;230:815-18.

- 20 – Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, Waters AP, Prasittisuk C. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science.* 1989;245:973-76.

- 21 – Qari SH, Goldman IF, Pova MM, Oliveira S, Alpers MP, Lal, AA. Wide distribution of the variant form of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *J Biol Chem.* 1991;266(25):16297-300.

- 22 – Wirtz, RA, Rosenberg R, Sattabongkot, J, Webster HK. Prevalence of antibody to heterologous circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Thailand. *Lancet.* 1990;336:593-95.

- 23 – Cochrane AH, Nardin EH, de Arruda M, Maracic M.; Clavijo P, Collins WE, Nussenzweig, R S. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43(5):446-51.

- 24 – Kain, KC, Keystone J, Franke ED, Lanar DE. Global Distribution of a variant of the circumsporozoite gene of *Plasmodium vivax*. *J Infect Dis.* 1991;164:208-10.

- 25 – Franke ED, Lucas CM, San Roman E, Wirtz RA. Prevalence of antibody to the variant repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;46(6):708-10.

- 26 – Branquinho MS, Lagos CBT, Rocha RM, Natal D, Barata JMS, Cochrane AH, Nardin E, Nussenzweig RS, Kloetzel J. Anophelines in the state of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK 247 and *P.malariae*. *Trans R Soc Trop Méd Hyg.* 1993;87:391-94.

- 27 – Arruda M, Souza RC, Veiga ME, Ferreira AF, Zimmerman RH. Prevalence of *Plasmodium vivax* variants VK 247 and *P. vivax*-like human malaria: a retrospective study in indigenous Indian populations of the Amazon region of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998;92:628.

- 28 – Mann VH, Good MF, Saul A. Diversity in the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: Does it matter? *Parasitol Today.* 1995;11(1):33-6.

- 29 – Kim T, Kim YJ, Song K-J, Song J-W, Cha SH, Kim YK, Shin YK, Suh IB, Lim CS. The molecular characteristics of circumsporozoite gene subtypes from *Plasmodium vivax* isolates in Republic of Korea. *Parasitol Res.* 2002;88:1051-54.

- 30 – Qari SH, Shi Y-P, Goldman, IF, Udhayakumar V, lpers M P, Collins WE, Lal AA. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. *Lancet*. 1993;341:780-83.
- 31 – Qari SH, Shi Y-P, Pova MM, Alpers MP, Deloron P, Murphy GS, Harjosuwarno S, Lal AA. Global occurrence of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. *J Infect Dis*. 1993;168:1485-9.
- 32 – Tobie JE. Detection of Malaria Antibodies – Immunodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1964;13(1):195-203.
- 33 – Collins WE, Lunde MN, Skinner C. Development of antibodies to *Plasmodium vivax* as measured by two different serologic techniques. *Am J Trop Med Hyg*. 1975;24(3):413-416.
- 34 – Beaudoin RL, Ramsey JM, Pacheco ND. *Antigens employed in immunodiagnostic tests for the detection of malarial antibodies*. Geneva: (WHO/MAL 81.952); 1981. Paper.
- 35 – Kuvin SF, Tobie JE, Evans CB, Coatney GR, Contacos PG. Fluorescent antibody studies on the course of antibody production and serum gamma globulin levels in normal volunteers infected with human and simian malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1962;11:429-36.
- 36 – Collins WE, Jeffery GM, Skinner JC. Fluorescent antibody studies in human malaria. II. Development and persistence of antibodies to *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 1964;13(2):257-60.
- 37 – Collins WE, Skinner JC, Jeffery GM. Studies on the persistence of malarial antibody response. *Am J Epid*. 1968;67(3):593-98.

- 38 – Ambroise-Thomas P. La réaction d'immunofluorescence dans l'étude séro-immunologique du paludisme. *Bull World Health Organ.* 1974;50:267-76.
- 39 – Ray K, Bhattacharya D, Mukherjee AK, Upreti HB, Chowdhuri AN. Evaluation of indirect immunofluorescent antibody test for detection of IgM specific antibodies in malaria. *J Commun Dis.* 1992;24(2):82-6.
- 40 – Gysin J, Fandeur T, Pereira da Silva L. Kinetics of the humoral immune response to blood-induced falciparum malaria in the squirrel monkey *Saimiri sciureus*. *Ann Immunol. (Paris).* 1982;133D(1):95-102.
- 41 – Biswas S, Saxena QB, Roy A. The natural occurrence of circulating antibodies In populations of endemic malarious areas. *Indian J Malariol.* 1990;27(3):139-48.
- 42 – Ambroise-Thomas P. Diagnosis and seroepidemiologic study of malaria by immunofluorescence, indirect hemagglutination and immunoenzymology. *Isr J Med Sci.* 1978;14(6):690-1.
- 43 – Ferreira AW, Sanchez MCA. Malária humana: padronização e otimização de testes sorológicos para diagnóstico individual e inquéritos soropidemiológicos. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1988;30(3):137-46.
- 44 – Abramo C, Fontes CJF, Krettli AU. Cross-reactivity between antibodies in the sera of individuals with leishmaniasis, toxoplasmosis, and Chagas' disease and antigens of the blood-stage forms of *Plasmodium falciparum* determined by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;53(2): 202-5.
- 45 – Jeffery GM, McWilson W, Collins WE, Lobel H. Application of the indirect fluorescent antibody method in a study of malaria endemicity in Mato Grosso, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1975;24(3):402-11.

- 46 – Carvalho ME, Glasser CM, Ciaravolo RMC, Etzel A, Santos LA, Ferreira CS. Sorologia de malária *vivax* no foco de Aldeia dos Índios, município de Peruíbe, estado de São Paulo, 1984 a 1986. *Cad Saúde Pub.* 1988;4(3):276-92.
- 47 – de Arruda M, Nardin EH, Nussenzweig RS, Cochrane AH. Sero-Epidemiological studies of malaria in indian tribes and monkeys of the Amazon basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41(4):379-85.
- 48 – Galvão ALA, Damasceno RG, Marques AP. Algumas observações sobre a Biologia dos anofelinos de importância epidemiológica de Belém, Pará. *Arq Hig.* 1942;12:51-111.
- 49 – Deane LM, Causey OR, Deane MP. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões Nordeste e Amazônica do Brasil. *Rev Serv Esp Saúde Pub.* 1948;1:827-966.
- 50 – Arruda M, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Maracic M, Ferreira AW. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Northern Brazil identified by immunoassay. *Am J Trop Med Hyg.* 1986;35(5):873-81.
- 51 – Klein TA, Lima JBP, Tada MS. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondonia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44(6):598-603.
- 52 – Klein TA, Lima JBP, Tada MS. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45(4):463-70.

- 53 – Wilkerson RC, Gaffigan TV, Lima JB. Identification of species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995;90(6):721-32.
- 54 – Wilkerson RC, Parsons TJ, Klein TA, Gaffigan TV, Bergo E, Consolim J. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. *J Med Entomol*. 1995;32(5):697-704.
- 55 – Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Cohn JE. Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: incongruence between Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction identification and analysis of mitochondrial DNA *COJ* gene sequences. *Ann Entomol Soc Am*. 2005;98(6):908-17.
- 56 – Pova MM, de Souza RT, Lacerda RN, Rosa ES, Galiza D, de Souza JR, Wirtz RA, Schlichting CD, Cohn JE. The importance of *Anopheles albitarsis* E and *A. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(2):163-8.
- 57 – Conn JE, Wilkerson RC, Segura MNO, De Souza RTL, Schliting CD, Wirtz RA, Pova MM. Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 66(1):18-22.
- 58 – Sallum MA, Wilkerson RC, Forattini OP. Taxonomic study of species formerly identified as *Anopheles mediopunctatus* and resurrection of *An. Costai* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1999;36(3):282-300.

- 59 – Marrelli MT. *Anopheles oswaldoi* (Diptera, Culicidae): *Análise do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico e da susceptibilidade à infecção com Plasmodium vivax* [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2000.
- 60 – Nascimento TFS, Lourenço-de-Oliveira R. *Anopheles halophylus*, a new species of the subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(6):801-11.
- 61 – Silva-do-Nascimento TF, Wilkerson RC, Lourenço-de-Oliveira R, Monteiro FA. Molecular confirmation of the specific status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and evidence of a new cryptic species within *A. triannulatus* in Central Brazil. *J Med Entomol*. 2006;43(3):455-9.
- 62 – Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Nettel JC, Villarreal C, Kain KC, Hernandez JE. Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern Mexico. *Infect Immun*. 1999;67:410-12.
- 63 – Corrêa RR, Forattini OP, Guarita OF, Rabello EX. Observações sobre o vôo do *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* e do *Anopheles* (*Kerteszia*) *bellator*, vetores de malária (Díptera, Culicidae). *Arq Hig Saúde Pub*. 1961;26:333-42.
- 64 – Ferreira E, Corrêa RR, Tomich A, Sá FT. Estudo sobre o raio de vôo do *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* e do *Anopheles* (*Kerteszia*) *bellator* em Guaratuba, litoral do estado do Paraná, Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 1969;21:819-22.

- 65 – Branquinho MS, Marrelli MT, Curado I, Natal D, Barata JMS, Tubaki R, Carréri-Bruno GC, Menezes RT, Kloetzel JK. Infecção do *Anopheles (Kerteszia) cruzii* por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium vivax* variante VK247 nos municípios de São Vicente e Juquitiba, São Paulo. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 1997;2(3):189-93.
- 66 – Lensen AHW. Infectivity of malarial parasites to mosquitoes: ‘the interdependent roles of parasite, vector and host’. *Ann Trop Med Parasitol*. 1996;90(4):359-65.
- 67 – Sattabongkot J, Suwanabun N, Rongnoparut P, Wirtz RA, Kain KC, Rosenberg R. Comparative test of DNA probes for detection of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein polymorphs VK 247 and VK 210. *J Infect Dis*. 1994;169:464-6.
- 68 – Kain KC, Brown AE, Mirabelli L, Webster HK. Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study. *J Infect Dis*. 1993;168:1323-6.
- 69 – Li J, Wirtz RA, McConkey GA, Sattabongkot J, Waters AP, Rogers MJ, McCutchan TF. *Plasmodium*: genus-conserved primers for species identification and quantitation. *Exp Parasitol*. 1995;81:182-90.
- 70 – Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosário VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;61:315-20.
- 71 – Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;58:283-92.

- 72 – Snounou G, Pinheiro L, Gonçalves A, Fonseca L, Dias, F, Brown KN, do Rosário VE. The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87: 649-53.
- 73 – Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi Y, Tanabe K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int.* 1997;46:91-95.
- 74 – Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, García ML, Mico M, Edu M, Alvar J. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(2):183-7.
- 75 – Alger J, Acosta MC, Lozano C, Velasquez C, Labrada LA. Stained smears as a source of DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91(5):589-91.
- 76 – Mendoza NM, Jaramillo CA, Guhl F, Padilla JC, Renteria MC. Diagnóstico de malaria por el método de la PCR anidada. *Biomédica.* 2001;21:320-7.
- 77 – Win TT, Lin K, Mizuno S, Zhou M, Liu Q, Ferreira UM, Tantular IS, Kojima S, Ishii A, Kawamoto F. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. *Trop Med Int Health.* 2002;7(3):231-9.
- 78 – Hänscheid T, Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria. *Trends Parasitol.* 2002;18(9):395-8.
- 79 – Hänscheid T. Update: Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(6):497-504.

- 80 – Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, Medici MC, Arcangeletti MC, Snounou G, Dettori G, Chezzi C. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *Infect Clin Microbiol.* 2004;42(3):1214-19.
- 81 – Farcas GA, Zhong KJY, Mazzulli T, Kain, KC. Evaluation of the RealArt Malaria real-time PCR assay for malaria diagnosis. *Infect Clin Microbiol.* 2004; 42(2):636-8.
- 82 – Collins WE. Major animal models in malaria research: simian. In: Wernsdorfer WH, McGregor I. *Principles and Practice of Malarology.* London: Churchill Livingstone. Medical Division of Longman Group UK Limited, 1988. p. 1473-1501.
- 83 – Coatney GR. The simian malarias: zoonoses, anthroponoses, or both? *Am J Trop Med Hyg.* 1971;20(6):796-803.
- 84 – Eyles DE, Coatney GR, Getz ME. Vivax-type malaria parasite of macaques transmissible to man. *Science.* 1960;131:1812-3.
- 85 – Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infection in human beings. *Lancet.* 2004;363:1017-24.
- 86 – Deane LM, Deane MP, Neto JF. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. *Bull World Health Organ.* 1966;35(5):805-8.
- 87 – Deane LM, Deane MP, Neto JF. Estudios sobre la transmision de la malaria simica y sobre una infeccion natural del hombre por *Plasmodium simium* en el Brasil. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1967;63(2):100-5.

- 88 – Geiman QM, Siddiqui WA. Susceptibility of a new world monkey to *Plasmodium malariae* from man. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18(3):351-3.
- 89 – Collins WE, Contacos PG, Krotoski WA, Howard WA. Transmission of four central American strains of *Plasmodium vivax* from monkey to man. *J Parasitol.* 1972;58(2):332-5.
- 90 – Collins WE, Sullivan JS, Fryauff DJ, Kendall J, Jennings V, Galland GG, Morris CL. Adaptation of a chloroquine-resistant strain of *Plasmodium vivax* from Indonesia to New World monkeys. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62(4):491-5.
- 91 – Sullivan JS, Strobert E, Yang C, Morris CL, Galland GG, Richardson BB, Bounngaseng A, Kendall J, McClure H.;Collins, WE. Adaptation of a strain of *Plasmodium vivax* from India to New World monkeys, chimpanzees, and anopheline mosquitoes. *J Parasitol.* 2001;87(6):1398-403.
- 92 – Stewart VA. *Plasmodium vivax* under the microscope: the *Aotus* model. *Trends Parasitol.* 2003;19(12):589-94.
- 93 – Sullivan JS, Sullivan JJ, Willians A, Grady KK, Bounngaseng A, Huber CS, Nace D, Williams T, Galland GG, Barnwell JW, Collins WE. Adaptation of a strain of *Plasmodium falciparum* from Ghana to *Aotus lemurinus griseimembra*, *A. nancymai* and *A. vociferans* monkeys. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(6):593-600.
- 94 – Dunn FL, Lambrecht FL. The hosts of *Plasmodium brasilianum* Gonder and von Berenberg-Gossler, 1908. *J Parasitol.* 1963;49(2):316-9.
- 95 – Deane LM, Neto JAF, OKumura M, Ferreira MO. Malaria parasites of Brazilian monkeys. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1969;11(2):71-86.

- 96 – Deane LM. Simian Malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 (suppl III):1-20.
- 97 – Fandeur T, Volney B, Peneau C, De Thoisy B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum* /*P. malariae* malaria. *Parasitol*. 2000;120:11-21.
- 98 – Deane LM, Neto JF, Sitônio JG. Novo hospedeiro natural do *Plasmodium simium* e do *Plasmodium brasilianum*: o mono, *Brachyteles arachnoides*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1968;10(5):287-8.
- 99 – Deane LM, Neto JAF. Malaria em macacos do estado do Rio Grande do Sul. Observações preliminares. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1969;11(5): 299-305.
- 100 – Deane LM *Plasmodia* of monkey and malaria eradication in Brazil. *Rev Latinoamer Microbiol Parasitol*. 1969;11:69-73.
- 101 – Deane LM, Deane MP, Neto JAF, Almeida FB. On the transmission of simian malaria in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1971;13(5):311-9.
- 102 – Arruda ME. Presença do *Plasmodium brasilianum* em macacos capturados na área de enchimento do reservatório da usina hidrelétrica de Tucuruí, Pará. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1985;80(3):367-9.
- 103 – Deane LM, Neto JAF, Sitônio JG. Estudos sobre a malária no estado do Espírito Santo. *Rev Bras Biol*. 1968;28(4):531-6.
- 104 – Cochrane AH, Collins, WE, Nussenzweig RS. Monoclonal antibody identifies circumsporozoite Protein of *Plasmodium malariae* and detects a common epitope on *Plasmodium brasilianum* sporozoites. *Infect Immun*. 1984;45(3):592-5.

- 105 – Contacos PG, Lunn JS, Coatney GR, Kilpatrick JW, Jones FE. Quartan-type malaria parasite of New World monkeys transmissible to man. *Science*. 1963;142:676.
- 106 – Li J, Collins WE, Wirtz RA, Rathore D, Lal A, McCutchan TF. Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Emerg Infect Dis*. 2001;2(1):35-42.
- 107 – Waters AP, Higgins DG, McCutchan TF. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:3140-44.
- 108 – Waters AP, Higgins DG, McCutchan TF. Evolutionary relatedness of some Primate models of *Plasmodium*. *Mol Biol Evol*. 1993;10(4):914-23.
- 109 – Escalante AA, Ayala FJ. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;91:11373-77.
- 110 – Leclerc MC, Hugot JP, Durand P, Renaud F. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from New and Old World primates (including humans): an 18S DNA cladistic analyses. *Parasitol*. 2004;129(Pt 6):677-84.
- 111 – Escalante AA, Barrio E, Ayala FJ. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the Circumsporozoite Protein Gene. *Mol Biol Evol*. 1995;12(4):616-26.
- 112 – Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. The evolution of primate parasites based on the gene encoding cytochrome *b* from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:8124-9.

- 113 – Rathore D, Wahl AM, Sullivan M, McCutchan TF. A phylogenetic comparison of gene trees constructed from plastid, mitochondrial and genomic DNA of *Plasmodium* species. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;114(1):89-94.
- 114– Volney B, Pouliquen J-F, de Thoisy B, Fandeur T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. *Acta Trop.* 2002;82:11-23.
- 115 – Ollomo B, Karch S, Bureau P, Elissa N, Georges AJ, Millet P. Lack of malaria parasite transmission between apes and humans in Gabon. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56(4):440-5.
- 116 – White NJ. Sharing malarias. *Lancet.* 2004;363:1006. Editorial.
- 117 – World Health Organization. *Basic malaria microscopy.* Geneve: WHO; 1991.
- 118 – Curado I. *Soroepidemiologia de malaria em áreas de baixa endemicidade no Estado de São Paulo* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1995.
- 119 – Curado I, Duarte AMRC, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti-bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae/brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;(92):235-43.
- 120 – Lal AA, de La Cruz VF, Campbell GH, Procell PM, Collins WE, McCutchan TF. Structure of the circumsporozoite gene of *P. malariae*. *Mol Biochem Parasitol.* 1988;30:291-4.

- 121 – McCutchan TF, Lal AA, Cruz VF, Miller LH, Maloy WL, Charoenvit Y, Beaudoin RL, Guerry P, Wistar R, Hoffman SL, Hockmeyer WT, Collins WE, Wirth D. Sequence of the immunodominant epitope for the surface protein on sporozoites of *Plasmodium vivax*. *Science*. 1985;230:1381-3.
- 122 – Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.
- 123 – Oskam L, Schoone GJ, Kroon CM, Lujan R, Davies JB. Polymerase chain reaction for detecting *Onchocerca volvulus* in pools of blackflies. *Trop Med Intern Health*. 1996;4:522.
- 124 – Pinotti M. The biological basis for the campaign against the malaria vectors of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1951;44(6):663-82.
- 125 – Shiff C. Integrated approach to malaria control. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):278-93.
- 126 – Rachou, R. G. Da infectibilidade dos anofelinos do subgênero *Kerteszia* pelos parasitas da malária humana. *A Folha Med*. 1946;27:181-3.
- 127 – Forattini OP, Gomes AC, Santos JLF, Kakitani I, Marucci D. Frequência ao ambiente humano e dispersão de mosquitos Culicidae em área adjacente à Mata Atlântica primitiva da planície. *Rev Saúde Pub*. 1990;24(2):101-7.
- 128 – Forattini, OP, Kakitani I, Massad E, Gomes AC. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 1 – Parity of blood seeking *Anopheles* (*Kerteszia*) in South-Eastern Brazil. *Rev Saúde Pub*. 1993;27(1):1-8.
- 129 - Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Gomes AC. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 4 – Survey of resting

- adults and synanthropic behaviour in South-Eastern Brazil. *Rev Saúde Pub.* 1993;27(6):398-411.
- 130 – Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, Mello RP. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. II – Habitat distribution. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(1):17-28.
- 131 – Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38(2):223-30.
- 132 – Camargo LMA. *A malária autóctone do Litoral Sul do Estado de São Paulo* [dissertação]. São Paulo: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina; 1992.
- 133 - Curado I. *Estudo Epidemiológico sobre a malária humana e simiana e infecção de anofelinos em áreas de baixa endemicidade no Estado de São Paulo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2003.
- 134 – Curado I, Malafronte RS, Duarte AMRC, Kirchgatter K, Branquinho MS, Galati EAB. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Acta Trop.* 2006;100:54-62.
- 135 – Azevedo AL. *Aspectos da Epidemiologia da malária e da biologia de Anopheles cruzii Dyar & Knab em vales montanhosos do sistema da Mata Atlântica* [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Oswaldo Cruz; 1997.

- 136 – Duarte AMRC. *Estudo de malária em macacos silvestres brasileiros* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1998.
- 137 – Duarte AMRC. *Aspectos Epidemiológicos da malária humana e simiana em área de influência do reservatório da usina hidrelétrica de Porto Primavera, município de Presidente Epitácio, São Paulo, Brasil* [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2003.
- 138 – Carvalho ME, Glasser CM, Santos LA, Ciravolo RMC. Nota sobre o encontro de casos autóctones de malária vivax por meio de técnica sorológica, em São Paulo. *Cad Saúde Pub.* 1985;1(2):250-2.
- 139 – Camargo LM, Ferreira UM, Krieger H, de Camargo EP, da Silva LP. Unstable hypoendemic malaria in Rondonia (western Amazon region, Brazil): epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51(1):16-25.
- 140 – Duarte EC, Gyorkos TW, Pang L, Abrahamowicz M. Epidemiology of malaria in a hypoendemic brazilian amazon migrant population: a cohort study. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(3):229-37.
- 141 – Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, Silva AJ. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):1087-89.
- 142 – Gal S, Wainscoat JS. Detection and quantitation of circulating *Plasmodium falciparum* DNA by a polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2006;336:155-62.

- 143 – Torres KL, Figueiredo DV, Zalis MG, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim W, Ferreira-da-Cruz M de F. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. *Parasitol Res.* 2006;98(6):519-24.
- 144 – Mcnamara DT, Kasenhagen LJ, Grimberg BT, Cole-Tobian J, Collins WE, Zimmerman PA. Diagnosing infection levels of four human malaria parasite species by a polymerase chain reaction / ligase detection reaction fluorescent microsphere-based assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(3):413-21.
- 145 – Machouart M, Bigois-Delemotte L, Aiana F, Brizion M, Biava MF, Collomb J, Fortier B. Development of a PCR assay followed by nonradioactive hybridization using oligonucleotides covalently bound to CovaLink NH microwells for detection of four *Plasmodium* species in blood samples from humans. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3279-84.
- 146 – Haqhdooost AA, Mazhari S, Bahadini K. Comparing the results of light microscopy with the results of PCR method in the diagnosis of *Plasmodium vivax*. *J Vector Borne Dis.* 2006;43(2):53-7.
- 147 – Chaorattanakawee S, Natalang O, Hananantachai H, Nacher M, Brockman A, Krudsood S, Looareesuwan S, Patarapotikul J. Storage duration and polymerase chain reaction of *Plasmodium falciparum* from blood spots on filter paper. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(1):42-4.
- 148 – Galinski MR, Arnot DG, Cochrane AH, Barnwell JW, Nussenzweig RS, Enea V. The circumsporozoite gene of the *Plasmodium cynomolgi* complex. *Cell.* 1987;48(2):311-9.

- 149 – Franke ED, Lucas CM, Chauca G, Wirtz RA, Hinostroza S. Antibody response to the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in naturally infected humans. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;46(3):320-6.
- 150 – Cerami C, Frevert U, Sinnis P, Takacs B, Clavijo P, Santos MJ, Nussenzweig V. The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell.* 1992;70(6):1021-3.
- 151 – Frevert U, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Takacs B, Nussenzweig V. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med.* 1993;177:1287-98.
- 152 – Sinnis P, Clavijo P, Feniö D, Chait BT, Cerami C, Nussenzweig V. Structural and functional properties of region II-plus of the malaria circumsporozoite protein. *J Exp Med.* 1994;180:297-306.
- 153 – Rathore D, Mccutchan TF, Garboczi DN, Teipa T, Hernáiz MJ, Le Brun LA, Lang SC, Linhardt RJ. Direct measurement of the interactions of glycosaminoglycans and a heparine decasaccharide with the malaria circumsporozoite protein. *Biochem.* 2001;40(8):11519-24.
- 154 – Ancsin JB, Kisilevsky R. A binding site for highly sulfated heparan sulfate is identified in the N terminus of the circumsporozoite protein. Significance for malarial sporozoite attachment to hepatocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(21):21824-32.
- 155 – Maccarana M, Sakura Y, Tawada A, Yoshida K, Lindahl U. Domain structure of Heparan Sulfates from bovine organs. *J Biol Chem.* 1996;271(30):17804-10.

- 156 – Herz J, Qiu S-Q, Oesterle A, Desilva H, Shafi S, Havel RJ. Initial hepatic removal of chylomicron remnants is unaffected but endocytosis is delayed in mice lacking the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92:4611-5.
- 157 – Ji Z-S, Sanan DA, Mahley RW. Intravenous heparinase inhibits remnant lipoprotein clearance from the plasma and uptake by the liver: *in vivo* role of heparan sulfate proteoglycans. *J Lipid Res.* 1995;36:583-92.
- 158 – Korochkina S, Barreau C, Pradel G, Jeffery E, Li J, Nataranjan R, Shabanowitz J, Hunt D, Frevert U, Vernick KD. A mosquito-specific protein family includes candidate receptors for malaria sporozoite invasion of salivary glands. *Cell Microbiol.* 2006;8(1):163-75.
- 159 – de la Cruz V, Lal AA, McCutchan TF. Sequence variation in putative functional domains of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. Implications for vaccine development. *J Biol Chem.* 1987;262,(25):11935-9.
- 160 – Lockyer MJ, Marsh K, Newbold CI. Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T cell epitopes of their circumsporozoite protein. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;37(2):275-80.
- 161 – Hughes AL. Circumsporozoite protein genes of malaria parasites (*Plasmodium spp.*): evidence for positive selection on immunogenic regions. *Genetics.* 1991;127:345-53.
- 162 – Suphavitai C, Looareesuwan S, Good MF. Analysis of circumsporozoite protein-specific immune responses following recent infection with *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(1):29-39.

- 163 – Jalloh A, van Thien H, Ferreira UM, Ohashi J, Matsuoka H, Kanbe T, Kikuchi A, Kawamoto F. Sequence variation in the T-cell epitopes of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein among field isolates is temporally stable: a 5-year longitudinal study in Southern Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1229-35 .
- 164 – Bhatia V, Bhattacharya RR. Wild isolates of *Plasmodium falciparum* from India show restricted polymorphism in T-helper cell epitopes of the circumsporozoite protein. *Acta Trop.* 2006;97(3):259-64.
- 165 – Schofield L. On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. *Parasitol Today.* 1991;7(5):99-105.
- 166 – Jesuino BS, Casimiro C, do Rosário VE, Silveira H. Effect of antibodies on the expression of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein gene. *Int J Med Sci.* 2006;3(1):7-10.
- 167 – Wongsrichanalai C, Webster HK, Permpanich B, Chuanak N, Ketrangsri S. Naturally acquired circumsporozoite antibodies and their role in protection in endemic falciparum and vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44(2):201-4.
- 168 – Zhou Z, Xiao L, Branch OH, Kariuk S, Nahlen BL, Lal AA. Antibody responses to repetitive epitopes of the circumsporozoite protein, liver stage antigen-1 and merozoite surface protein-2 in infants residing in a *Plasmodium falciparum*-hyperendemic area of Western Kenya. XIII. Asembo Bay Cohort Project. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(1):7-12.
- 169 – Braga EM, Carvalho LH, FontesCJ, Krettli A. Low cellular response *in vitro* among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(3):299-303.

- 170 – John CC, Zickafoose JS, Sumba PO, King CL, Kazura JW. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* antigens circumsporozoite protein, thrombospondin-related adhesive protein, and liver stage antigen-1 vary by ages of subjects and by season in a highland area of Kenya. *Infect Immun.* 2003;71(8):4320-5.
- 171 – Maheswary NP, Perpanich B, Rosenberg R. Presence of antibody to a heterologous circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* (VK247) in south-eastern Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86:28.
- 172 – Suwanabun N, Sattabongkot J, Wirtz RA, Rosenberg R. The epidemiology of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein polymorphs in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50(4):460-4.
- 173 – González JM, Hurtado S, Arévalo-Herrera M, Herrera S. Variants of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (VK210 and VK247) in Colombian isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(5):709-12.
- 174 – Coleman RE, Sithiprasasna R, Kankaew P, Kiattibut C, Ratanawong S, Khuntirat B, Sattabongkot J. Naturally occurring mixed infections of *Plasmodium vivax* VK210 and *P. vivax* VK247 in *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Thailand. *J Med Entomol.* 2002;39(3):556-9.
- 175 – Cui L, Mascorro CN, Fan Q, Rzomp KYA, Khuntirat B, Zhou G, Chen H, Yan G, Sattabongkot J. Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in Western Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(5):613-9.
- 176 – Nardin EH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Collins WE, Harinasuta KT, Tapchaisri P, Chomcharn Y. Circumsporozoite proteins of human parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *J Exp Med.* 1982;156:20-30.

- 177 – Campbell GH, Aley SB, Ballou WR, Hall T, Hockmeyer WT, Hoffman SL, Hollingdale MR, Howard RJ, Lyon JA, Nardin EH, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Tsang VCW, Weber JL, Wellems TE, Young JF, Zavala F. Use of synthetic and recombinant peptides in the study of host-parasite interactions in the malarias. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;37(3):428-44.
- 178 – Carvalho LH, Fontes CJ, Fernandes AA, Marinuzzi HC, Krettli AU. Cross-reactive cellular immune response to circumsporozoite proteins of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in malaria-exposed individuals. *Parasite Immunol.* 1997;19(2):47-52.
- 179 – Suh IB, Lee K-H, Kim YR, Woo SK, Kang HY, Won YD, An SSA, Cho M, Cho D, Lim CS. Comparison of immunological response to the various types of circumsporozoite proteins of *Plasmodium vivax* in malaria patients of Korea. *Microbiol Immunol.* 2004;48(2):119-23.
- 180 – Orlandi-Pradines E, Penhoat K, Durand C, Pons C, Bay C, Pradines B, Fusai T, Josse R, Dubrous P, Meynard JB, Durand JP, Migliani R, Boutin JP, Druilhe P, Rogier C. Antibody responses to several malaria pre-erythrocytic antigens as a marker of malaria exposure among travelers. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(6):979-85.
- 181 – Rodriguez MH, Gonzalez-Ceron L, Hernandez JE, Nettel JA, Villarreal C, Kain KC, Wirtz RA. Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(1):122-7.

- 182 – Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Santillan F, Chavez B, Nettel JA, Hernandez-Avila JE, Kain KC. *Plasmodium vivax*: ookinete destruction and oocyst development arrest are responsible for *Anopheles albimanus* resistance to circumsporozoite phenotype VK247 parasites. *Exp Parasitol*. 2001;98:152-61.
- 183 – Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Chavez-Munguia B, Santillan F, Nettel JA, Hernandez-Avila JE. *Plasmodium vivax*: impaired escape of VK210 phenotype ookinetes from the midgut blood bolus of *Anopheles pseudopunctipennis*. *Exp Parasitol*. Epub ahead of print; 2006.
- 184 – Zakeri S, Albouie Mehrizi A, Djadid ND, Snounou G. Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical *Plasmodium vivax* isolates from Iran. *Trop Med Int Health*. 2006;11(5):729-37.
- 185 – Kain KC, Brown AE, Lanar DE, Ballou WR, Webster H. Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49(4):478-84.
- 186 – Machado RLD, Figueiredo Filho AF, Calvosa VSP, Figueredo MC, Nascimento JM, Pova MM. Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitemia. *Braz J Infect Dis*. 2003;7(3):175-7.
- 187 – Molineaux L, Gramiccia G. *The Garki Project: Research on the epidemiology and control of malaria in the Sudan savanna of West Africa*. Geneva: World Health Organization; 1980.
- 188 – Wykes H, Good MF. Memory B cell responses and malaria. *Parasite Immunol*. 2006;28(1-2):31-4.

- 189 – Schofield ML, Mueller I. Clinical immunity to malaria. *Curr Mol Med.* 2006;74(4):546-53.
- 190 – Andrade JCR, Anjos CFD, Wanderley DMV, Alves MJCP, Campos PC. Foco de malária no estado de São Paulo (Brasil). *Rev Saúde Públ.* 1986;20(4):323-6.
- 191 – Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, Purnomo, Masbar S. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:65-76.
- 192 – Rogier C, Trape JF. Malaria attacks in children exposed to high transmission: who is protected? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87(3):245-6.
- 193 – Popov, AF. Parasitic carriage of the causative agents of tropical malaria. *Med Parazitol. (Mosk)* 1999;1:15-7.
- 194 – Verhoef H, West CE, Ndeto P, Burema J, Beguin Y, Kok FJ. Serum transferring receptor concentration indicates increased erythropoiesis in Kenyan children with asymptomatic malaria. *Am J Clin Nutr.* 2001;74:767-75.
- 195 – Owusu-Agyei S, Koram KA, Baird JK, Utz GC, Binka FN, Nkrumah FK, Fryauff DJ, Hoffman SL. Incidence of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection following curative therapy in adult residents of Northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(3):197-203.
- 196 – Baird JK, Agyei SO, Utz GC, Koram K, Barcus MJ, Jones TR, Fryauff DJ, Binka FN, Hoffman SL, Nkruman FN. Seasonal malaria attack rates in infants and young children in Northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(3):280-6.

- 197 – Vinetz JM, Gilman RH. Asymptomatic *Plasmodium* parasitemia and the ecology of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(6):639-40.
Editorial
- 198 – Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LHP, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(6):641-8.
- 199 – Marcano TJ, Morgado A, Tosta CE, Coura JR. Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(4):369-76.
- 200 – Branch OL, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava, FF, Roncal N, Alvarez E, Perez EJ, Gotuzzo E. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malar J.* 2005;4:27.
- 201 – Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, Calderon M, Lescano AG, Montenegro SH, Calampa C, Vinetz JM. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;69(1):45-52.
- 202 – Alves J, Roque AL, Cravo P, Valdez T, Jelinek T, Rosário VE, Arez AP. Epidemiological characterization of *Plasmodium falciparum* in the Republic of Cabo Verde: implications for potential large-scale reemergence of malaria. *Malar J.* 2006;5:32.

- 203 – Abel L. Apport de l'épidémiologie génétique pour l'étude de la susceptibilité/résistance au paludisme dans les populations humaines. *Bull Soc Pathol Exot.* 1999;92(4):256-60.
- 204 – Sokhna C-S, Rogier C, Dieye A, Trape J-F. Host factors affecting the delay of reappearance of *Plasmodium falciparum* after radical treatment among a semi-immune population exposed to intense perennial transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(2):266-70.
- 205 – Dessein AJ, Chevillard C, Marquet S, Henri S, Hillaire D, Dessein H. Genetics of parasitic infections. *Drug Metab Dispos.* 2001;29(4):484-8.
- 206 – Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):564-94.
- 207 – Migot-Nabias F, Pelleau S, Watier L, Guitard J, Toly C, De Araujo C, Ngom MI, Chevillard C, Gaye O, Garcia A. Red blood cell polymorphisms in relation to *Plasmodium falciparum* asymptomatic parasite densities and morbidity in Senegal. *Microbes Infect.* Epub ahead of print; 2006.
- 208 – Beiguelman B, Alves FP, Moura MM, Engracia V, Nunes ACS, Heckmann MIO, Ferreira RGM, Silva LHP, Camargo EP, Krieger H. The association of genetic markers and malaria infection in the Brazilian Western Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(4):455-60.
- 209 – Mombo L-E, Ntoumi F, Bisseye C, Ossari S, Lu CY, Nagel RL, Krishnamoorthy R. Human genetic polymorphisms and asymptomatic *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese schoolchildren. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(2):186-90.

- 210 – Domarle O, Migot-Nabias F, Dilkington H, Elissa N, Touré FS, Mayombo J, Cot M, Deloron P. Family analysis of malaria infection in Dienga, Gabon. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(2):124-9.
- 211 – Hill AV, Allsopp CE, Kwiatrowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, Mcmichael AJ, Greenwood BM. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature.* 1991;352(6336):595-600.
- 212 – Hill AV, Elvin J, Willis AC, Aidoo M, Allsopp CE, Gotch FM, Gao XM, Takiguchi M, Greenwood BM, Townsend AR, Mcmichael AJ, Whittle HC. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature.* 1992;360:434-9.
- 213 – Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64(1, 2):1-11.
- 214 – Garcia A, Marquet S, Brucheton B, Hillaire D, Cot M, Figuet N, Dessein AJ, Abel L. Linkage analysis of blood *Plasmodium falciparum* levels: interest of the 5q31-q33 chromosome region. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(6):705-9.
- 215 – Rihet P, Traore Y, Aucan C, Traore-Leroux T, Kumulunqui B, Traore AS, Abel L, Fumoux F. Genetic dissection of *Plasmodium falciparum* blood infection levels and other complex traits related to human malaria infections. *Parassitologia.* 1999;41(1-3) :83-7.
- 216 – Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol.* 2006;28(1-2):35-49.

- 217 – Luty AJF, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herlich K, Schmid D, Weinberg JB, Kremsner PG. Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 2000;68(7):3909-15.
- 218 – Perkins DJ, Weinberg JB, Kremsner PG. Reduced interleukin-12 and transforming growth factor- β 1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis.* 2000;182:988-92.
- 219 – Boutlis CS, Lagog M, Chaisavaneeyakorn S, Misukonis MA, Bockarie MJ, Mgone CS, Wang Z, Morahan G, Weinberg JB, Udhayakumar V, Anstey NM. Plasma interleukin-12 in malaria tolerant Papua New Guineans: inverse correlation with *Plasmodium falciparum* parasitemia and peripheral blood mononuclear nitric oxide synthase activity. *Infect Immun.* 2003;71(11):6354-7.
- 220 – Akanmori BD, Kurtzhals JA, Goka BQ, Adabayeri V, Ofori MF, Nikrumah FK, Behr C, Hviid L. Distinct patterns of cytokine regulation in discrete clinical forms of *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11(1):113-8.
- 221 – Chaisavaneeyakorn S, Othoro C, Shi YP, Otieno J, Chaiyaros C, Lal AA, Udhayakumar V. Relationship between plasma interleukin-12 (IL-12) and IL-18 levels and severe malarial anemia in an area of holoendemicity in Western Kenya. *Clin Diag Lab Immunol.* 2003;10(3):362-6.
- 222 – May J, Lell B, Luty AJF, Meyer CG, Kremsner PG. Plasma interleukin-10: tumor necrosis factor (TNF)- α ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis.* 2000;182:1570-3.

- 223 – Smith T, Genton B, Baea K, Gibson N, Taime J, Narara A, Al-Yaman F, Beck HP, Hii J, Alpers M. Relationships between *Plasmodium falciparum* infection and morbidity in a highly endemic area. *Parasitol.* 1994;109(Pt 5): 539-49.
- 224 – Deloron P, Jaureguiberry G, Gaudebout C, Le Bras J, Savel J, Pocidal JJ. Immunological characteristics of malaria antibodies in two regions of Madagascar. *J Clin Microbiol.* 1987;25(5):911-5.
- 225 – Fesel C, Goulart LF, Neto AS, Coelho A, Fontes CJF, Braga EM, Vaz NM. Increased polyclonal immunoglobulin reactivity toward human and bacterial proteins is associated with clinical protection in human *Plasmodium* infection. *Malar J.* 2005;4:5.
- 226 – Souza JB, Todd J, Krishegowda G, Gowda DC, Kwiatkowski D, Riley EM. Prevalence and boosting of antibodies to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and evaluation of their association with protection from mild and severe clinical malaria. *Infect Immun.* 2002;70(9):5045-51.
- 227 – Braga EM, Barros RM, Reis TA, Fontes CJF, Morais CG, Martins MS, Krettli AU. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(5):461-6.
- 228 – Boutlis CS, Gowda DC, Naik RS, Maguire GP, Mgone CS, Bockarie MJ, Lagog M, Ibam E, Lorry K, Anstey NM. Antibodies to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols: inverse association with tolerance of parasitemia in Papua New Guinean children and adults. *Infect Immun.* 2002;70(9):5052-7.

- 229 – Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(4):582-7.
- 230 – Perera L, Bandara S, Holm I, Longacre S, Handunetti SM, Udagama-Randeniya PV. Comparison of naturally acquired antibody responses against the C-terminal processing products of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. *Int J Parasitol.*, Epub ahead of print; 2006.
- 231 – Tongren JE, Drakeley CJ, McDonald SLR, Reyburn HG, Manjurano A, Nkya WMM, Lemnge MM, Gowda CD, Todd JE, Corran PH, Riley EM. Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. *Infect Immun.* 2006;74(1):257-64.
- 232 – Abdel-Latif MS, Dietz K, Issifou S, Kremsner PG, Klinkert M-Q. Antibodies to *Plasmodium falciparum* RIFIN proteins are associated with rapid parasite clearance and asymptomatic infection. *Infect Immun.* 2003;71(1):6229-33.
- 233 – Cortés A, Mellombo M, Benet A, Reeder JC, Anders RF. Geographical structure of diversity and differences between symptomatic and asymptomatic infections for *Plasmodium falciparum* vaccine candidate AMA1. *Infect Immun.* 2003;71(3):1416-26.
- 234 – Taylor DW, Zhou A, Marsilio LE, Thuita LW, Leke EB, Branch OE, Gowda DC, Long C, Leke RFG. Antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum* – infected erythrocytes to chondroitin sulphate A and to the C terminus of Merozoite Surface Protein 1 correlate with reduced placental malaria in Caneronian women. *Infect Immun.* 2004;72(3):1603-7.

- 235 – Cramer JP, Mockenhaupt FP, Möhl I, Dittrich S, Dietz E, Otchwemah RN, Ehrnhardt S, Bienzle U, Jelinek T. Allelic dimorphism of the erythrocyte binding antigen-175 (*eba-175*) gene of *Plasmodium falciparum* and severe malaria: significant association of the C-segment with fatal outcome in Ghanaian children. *Malar J.* 2004;3:11.
- 236 – Touré FS, Bisseye C, Mavoungou E. Imbalanced distribution of *Plasmodium falciparum* EBA-175 genotypes related to clinical status in children from Bakoumba, Gabon. *Clin Med Res.* 2006;4(1):7-11.
- 237 – Nielsen MA, Staalsoe T, Kurtzhals JA, Goka BQ, Dodoo D, Alifrangis M, Theander TG, Akanmori BD, Hviid L. *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression varies between isolates causing severe and nonsevere malaria and is modified by acquired immunity. *J Immunol.* 2002;168(7):3444-50.
- 238 – Hviid L, Staalsoe T. Malaria immunity in infants: a special case of a general phenomenon? *Trends Parasitol.* 2004;20(2):66-72.
- 239 – Jensen ATR, Magistrado P, Sharp S, Joergensen L, Lavsten T, Chiucchiuini A, Salanti A, Vestergaard LS, Lusingu JP, Hermesen R, Sauerwein R, Christensen J, Nielsen MA, Hviid L, Sutherland C, Staalsoe T, Theander T, G. *Plasmodium falciparum* associated with severe childhood malaria preferentially express PfEMP1 encoded by group A *var* genes. *J Exp Med.* 2004;199(9):1179-90.
- 240 – Kaestli M, Cockburn I A, Cortes A, Baea, K, Rowe JA, Beck HP. Virulence of malaria is associated with differential expression of *Plasmodium falciparum* var gene subgroups in a case-control study. *J Infect Dis.* 2006;193(11):1567-74.

- 241 – Rottmann M, Lavsten T, Mugasa JP, Kaestli M, Jensen AT, Muller D, Theander T, Beck HP. Differential expression of var gene groups is associated with morbidity caused by *Plasmodium falciparum* infection in Tanzanian children. *Infect Immun.* 2006;74(7):3904-11.
- 242 – Drakeley CJ, Bousema JT, Akim NI, Teelen K, Roeffen W, Lensen AH, Bolmer M, Eling W, Saverwein RW. Transmission-reducing immunity is inversely related to age in *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Parasite Immunol.* 2006;28(5):185-90.
- 243 – Schneider AG, Mercereau-Puijalon O. A new *Apicomplexa*-specific protein kinase family: multiple members in *Plasmodium falciparum*, all with an export signature. *BMC Genomics.* 2005;6:30.
- 244 – Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Donnelly CA, Walmsley M, Alpers MP, Walliker D, Day KP. Genetic diversity and dynamics of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* populations in multiply infected children with asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea. *Parasitol.* 2000;121:257-72.
- 245 – Kun JFJ, Missinou MA, Lell B, Souric M, Knoop H, Bojowald B, Dangelmaier O, Kremsner PG. New emerging *Plasmodium falciparum* genotypes in children during the transition phase from asymptomatic parasitemia to malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(6):653-8.
- 246 – Boland A, Nebié I, Cuzin-Quattara N, Traore A, Espósito F, Berzins K. Antibody-mediated *in vitro* growth inhibition of field isolates of *Plasmodium falciparum* from asymptomatic children in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(6):728-33.

- 247 – Silue KD, Felger I, Utzinger J, Beck HD, Smith TA, Tanner M, N'goran EK. Prevalence, genetic diversity and multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in schoolchildren in central Cote D'Ivoire. *Med Trop. (Mars.)*. 2006;66(2):149-56.
- 248 – Guerra-Neira A, Rubio JM, Royo JR, Ortega JC, Auñón AS, Diaz PB, Llanes AB. *Plasmodium* diversity in non-malaria individuals from the Bioko Island in Equatorial Guinea (West Central-Africa). *Int J Health Geogr.* 2006;5:27.
- 249 – Gozalo A, Lucas C, Cachay M, Montoya E, Ballou WR, Wooster MT, Watts DM. Prevalence of antibody to *Plasmodium falciparum* antigens among feral *Saimiri* monkeys in the Amazon basin region of Peru. *J Med Primatol.* 1997;26:204-206.
- 250 – Duarte AMRC, Porto MAL, Curado I, Malafronte RS, Hoffman EHE, Oliveira SG, da Silva AMJ, Kloetzel JK, Gomes AC. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. *J Med Primatol.* 2006;35:87-96.
- 251 – Lal AA, Goldman IF. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium reichenowi*, a chimpanzee malaria parasite evolutionarily related to the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 1991;266(11):6686-9.
- 252 – Teodoro U, Guilherme ALF, Lozovei AL, la Salvia Filho V, Fukushigue Y, Spinosa RP, Ferreira MEMC, Barbosa OC, Lima EM. Culicídeos do lago de Itaipu, no rio Paraná, sul do Brasil. *Rev Saúde Pub.* 1995;29(11):6-14.

- 253 – Lourenço-de-Oliveira R, Luz SLB. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon – II. Vertical distribution and frequency of Anopheline Species inside and outside the forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91(6):687-94.
- 254 – Tadei WP, Thatcher BD. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2000;42(2):87-94.
- 255 – Tubaki RM, Menezes RMT, Cardoso Junior RP, Bergo ES. Studies on entomological monitoring: mosquito species frequency in riverine habitats of the Igarapava dam, southern region, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2004;46(4):223-9.
- 256 – Lourenço-De-Oliveira R, Guimarães AEG, Arlé M, Silva TF, Castro MG, Motta MA, Deane LM. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1989;84(4):501-14.
- 257 – Corrêa RR, Ramos AS. Os anofelinos da região meridional do estado de São Paulo. *Arq Hig São Paulo*. 1942;7:37-57.
- 258 – Gabaldon A, Cova-Garcia P. Zoogeografia de los anofelinos en Venezuela: I. Los dos vectores principales. *Tijeretazos Malaria*. 1946;10(1):19-32.
- 259 – Tadei WP, Santos JMM, Costa WLS, Scarpassa VM. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1988;30(3):221-51.

- 260 – Oliveira-Ferreira J, Lourenço-De-Oliveira R, Teva A, Deane LM, Daniel-Ribeiro CT. Natural malaria infections in Anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;43(1):6-10.
- 261 – Galvão AA, Lane J. Notas sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo. IV. Sobre a infecção experimental do *Anopheles albitarsis* e *A. strodei* da cidade de São Paulo, pelo *Plasmodium vivax*. *Fol Clin Biol.* 1937;3:65-9.
- 262 – Fonseca JAB, Unti O. Infecção experimental de anofelinos de regiões indenes à malária. *Fol Clin Biol.* 1943;1:43-52.
- 263 – Floch H, Abonnenc E. *A. triannulatus* Neiva et Pinto en Guyane Française. Morphologie des oeufs et infection expérimentale par *P. falciparum* et *P. vivax*. *Inst Past de la Guyane Française et du Territ Del'Inini.* 1944;77:1-7.
- 264 – Faran ME, Lithicum KJ. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst.* 1981;13(1):1-81.
- 265 – Guimarães AE, Mello RP, Lopes CM, Alencar JA, Gentile C. Prevalência de Anofelinos (Diptera: Culicidae) no crepúsculo vespertino em áreas da usina hidrelétrica de Itaipu, no município de Guairá, estado do Paraná, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92(6):745-54.
- 266 – Linthicum KJ. A revision of the *Argyritarsis* Section of the Subgenus *Nyssorhynchus*. *Mosq Syst.* 1988;20(2):99-271.
- 267 – Russel PF, Rozeboom LE, Stone A. *Keys to the Anopheline mosquitoes of the world with notes on their identification, distribution, biology and relation to malaria.* Philadelphia: American Entomological Society; 1943
- 268 – Deane LM. Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(Suppl. II):5-14.

- 269 – Conn JE. Systematics and population level analysis of *Anopheles darlingi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93(5):647-50.
- 270 – Rachou RG, Lima MM, Neto JAF, Martins CM. Alguns dados sobre o comportamento dos mosquitos de Ponta Grossa (Florianópolis, Santa Catarina). *Rev Bras Malariol D Trop*. 1958;10:417-27.
- 271 – Forattini OP, Lopes OS, Rabello EX. Investigações sobre o comportamento de formas adultas de mosquitos silvestres no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pub*. 1968;2(2):111-73.
- 272 – Forattini OP, Gomes AC, Galati EAB, Rabello EX, Iversson LB. Estudos ecológicos sobre mosquitos Culicidae no sistema da Serra do Mar, Brasil. 2 – Observações no ambiente domiciliar. *Rev Saúde Pub*. 1978;12:476-96.
- 273 – Guimarães AE, Arlé M. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, Brasil. I – Distribuição estacional. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984;74(3):309-23.
- 274 – Gomes AC, Forattini OP, Natal D. Composição e atividade de mosquitos Culicidae. Emprego de armadilha CDC no vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pub*. 1987;21(5):363-70.
- 275 – Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, Sant'anna A. Ecologia dos mosquitos (Diptera: Culicidae) em áreas do Parque Nacional da Serra da Bocaina, Brasil. I – Distribuição por habitat. *Rev Saúde Pub*. 2000;34(3):243-50.
- 276 – Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, Sant'anna A. Ecologia de mosquitos em áreas do Parque Nacional da Serra da Bocaina. II – Frequência mensal e fatores climáticos. *Rev Saúde Pub*. 2001;35(4):392-9.

- 277 – Guimarães AE, Mello RP, Lopes CM, Gentile C. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. I – Monthly frequency and climatic factors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(1):1-16.
- 278 – Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, Mello RP. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. III – Daily biting rhythms and lunar cycle influence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(6):753-60.
- 279 – Root FC. Studies on Brazilian mosquitoes. I – The Anophelines of the Nyssorhynchus Group. *Am J Hyg*. 1926;6(5):684-717.
- 280 – Shannon RC, Davis NC. Observations of the Anophelini (Culicidae) of Bahia, Brazil. *Ann Ent Soc Am*. 1930;23(3):467-505.
- 281 – Kumm HW, Komp WHW, Ruiz H. The mosquitoes of Costa Rica. *Am J Trop Med*. 1940;20(3):385-422.
- 282 – Ünti O. Anofelinos do Vale do Paraíba. *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* Root, 1926 com a descrição de três variedades novas. *Publ Serv Prof Mal*. 1941;33:3-18.
- 283 – Arnett Jr H. Notes on the distribution, habits and habitats of some Panama Culicines (Diptera: Culicidae). Part IV. *Jour N Y Ent Soc*. 1950;58:99-115.
- 284 – Garcia M, Renderos RA. Mosquitos de la República Argentina. I. Tribu *Anophelini* (Diptera – Culicidae – Culicinae). *An Com Cient Prov Bs As*. 1962;3:103-212.

- 285 – Kumm HW. Observations on two malaria vectors and distribution records of other *Anopheles* in the states of Bahia and Sergipe, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol.* 1932;26(1):1-6.
- 286 – Galvão AA, Lane J, Corrêa R. Notas sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo. V. Sobre os *Nyssorhynchus* de Novo Oriente. *Rev Biol Hyg.* 1937;8:37-45.
- 287 – Rachou RG, Ricciardi, I. Contribuição ao conhecimento da distribuição Geográfica dos anofelinos no Brasil: estado do Paraná (distribuição por Municípios e localidades). *Rev Bras Malariol.* 1951;3(3):423-47.
- 288 – Antunes PCA, Lane J. Nota sobre a distribuição geográfica dos Culicídeos (Diptera) de São Paulo (Brasil). *Rev Biol Hyg.* 1933;4(3):91-7.
- 289 – Rozeboom LE. The role of some common Anopheline mosquitoes of Panama in the transmission of malaria. *Am J Trop Med.* 1938;18:289-302.
- 290 – Galvão ALA. Contribuição ao conhecimento dos anofelinos do Grupo *Nyssorhynchus* de São Paulo e regiões vizinhas (Diptera, Culicidae). *Arch Zool São Paulo.* 1940;1:399-484.
- 291 – Xavier MMSP, Rebelo JM. Espécies de *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) em área endêmica de malária, Maranhão, Brasil. *Rev Saúde Pub.* 1999;33(6):535-41.
- 292 – Oliveira-Pereira YN, Rebelo JM. Espécies de *Anopheles* no município de Pinheiro (Maranhão), área endêmica de malária. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000;33(5):443-50.

- 293 – Rebelo JM, Silva AR, Ferreira LA, Vieira JA. *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) e a malária em Buriticupu – Santa Luzia, pré-Amazônia maranhense. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30(2):107-11.
- 294 – Silva-Vasconcelos A, Kató MYN, Mourão EN, Souza RTL, Lacerda RNL, Sibajev A, Tsouris P, Póvoa MM, Momen H, Rosa-Freitas MG. Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(2):151-61.
- 295 – Galvão ALA, Lane J. Notas sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo. VII. Estudo sobre as variedades deste grupo com a descrição do *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* Arrib., 1878 var. *limai* n. var. *Ann Fac Med São Paulo*. 1937;13:11-38.
- 296 – Rozeboom LE. Subspecific variations among neotropical mosquitoes, and their importance in the transmission of malaria. *Am J Trop Med*. 1942;22(3):235-55.
- 297 – Ferreira E. Distribuição geográfica dos anofelinos no Brasil e sua relação com o estado atual de erradicação da malária. *Rev Bras Malariol D Trop*. 1964;16(3):329-48.
- 298 – Lopes J, Lozovei AL. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do norte do estado do Paraná, Brasil. I – Coleta ao longo de leito de ribeirão. *Rev Saúde Pub*. 1995;29(3):183-91.
- 299 – Davis NC. A consideration of variability in the *Nyssorhynchus* Group of the Genus *Anopheles*. *Am J Hyg*. 1928;8(4):539-63.

- 300 – Rubio-Palis Y. Is *Anopheles argyritarsis* a vector of malaria in the Neotropical region? *J Am Mosq Control Assoc.* 1993;5(4):470-1.
- 301 – Galvão AA, Lane JJ. – Notas sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo. *Ann Fac Med São Paulo.* 1936;12(2):269-88.
- 302 – Carvalho SCG, Martins Junior AJ, Lima JBP, Valle P. Temperature influence on embryonic development of *Anopheles albitarsis* and *Anopheles aquasalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(8):117-20.
- 303 – Davis NC, Kumm HHW. Further incrimination of *Anopheles darlingi* Root as a transmitter of malaria. *Am J Trop Med.* 1932;12:93-5.
- 304 – Galvão AL, Barreto MP. Variação de comportamento do *A. albitarsis* Arribáizaga, 1878 e *A. triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922) de São Paulo. *Rev Biol Hyg.* 1938;9(2):144-57.
- 305 – Guimarães AE, Lopes CM, Mello RP, Alencar J. Ecologia de mosquitos em áreas do Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. 1 – Distribuição por habitat. *Cad Saúde Pub.* 2003;19(4):1107-11.
- 306 – Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 7 – Behaviour of adults *Nyssorhynchus* anophelines with special reference to *Anopheles albitarsis* s.l. in South-Eastern Brazil. *Rev Saúde Pub.* 1995;29(1):20-6.
- 307 – Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 12 – Host-seeking behaviour of *Anopheles albitarsis* s. l. in South-Eastern Brazil. *Rev Saúde Pub.* 1996;30(4):299-303.

- 308 – Kakitani I, Forattini OP. Paridade e desenvolvimento ovariano de *Anopheles albitarsis* l. s. em áreas de agroecossistema irrigado. *Rev Saúde Pub.* 2000;34(1):33-8.
- 309 – Póvoa MM, Wirtz RA, Lacerda RNL, Miles MA, Warnhust D. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon Region, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(2):179-84.
- 310 – Harris AF, Matias-Arnet A, Hill N. Biting time of *Anopheles darlingi* in the Bolivian Amazon and implications for control of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;100(1):45-7.
- 311 – Shannon RC. Anophelines of the Amazon valley. *Proc Ent Soc Wash.* 1933;35(7):116-43.
- 312 – Rubio-Palis Y. Vectorial capacity of anophelines in Western Venezuela (Capacidad vectorial de los anofelinos del occidente de Venezuela). *J Am Mosq Control Assoc.* 1992;8:307.
- 313 – Guimarães AE, Gentile C, Alencar J, Lopes CM, Mello RP. Ecology of Anopheline (Diptera: Culicidae) malaria vectors around the Serra da Mesa reservoir, State of Goiás, Brazil. 1 – Frequency and climatic factors. *Cad Saúde Pub.* 2004;20(1):201-302.
- 314 – Brochero H, Pareja PX, Ortiz G, Olano VA. Sitios de cría y actividad de picadura de especies de *Anopheles* en el municipio de Cimitarra, Santander, Colombia. *Biomedica.* 2006;26:269-77.
- 315 – Neto JAF, Deane LM, Carneiro EWB. Infecção natural de guaribas, *Alouatta belzebul belzebul* (L., 1766), pelo *Plasmodium brasilianum* Gonder & Berenberg-Gossler, 1908, no estado do Maranhão, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1970;12(3):169-74.

- 316 – Rodrigues SWF. *Características ecológicas da fauna de anofelinos (Diptera: Culicidae) em área de transmissão de malária autóctone, na Região serrana do Espírito Santo* [dissertação]. Vitória: Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo; 2005
- 317 – Lee J-S, Kho W-G, Lee H-W, Seo M, Lee W-J. Current status of vivax malaria among civilians in Korea. *Korean J Parasitol.* 1998;36(4):241-8.
- 318 – Bradley DJ, Warhust DC, Blaze M, Smith V, Willians J. Malaria imported into the United Kingdom in 1996. *Euro Surveill.* 1998;3(4):40-2.
- 319 – Ungureanu F, Killick-Kendrick R, Garnham PC, Branzei P, Romanescu C, Shute PG. Prepatent periods of a tropical strain of *Plasmodium vivax* after inoculations of tenfold dilutions of sporozoites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977;70(5-6):482-3.
- 320 – Elliot R. The influence of vector behaviour on malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 1972;21(5):755-63.