**Estudo da Transmissão de Malária em
população ribeirinha do Estado do Amapá,
Brasil- Sorologia humana e uso de ELISA em
anofelinos.**

Maria Stela Branquinho

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Epidemiologia da
Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para
obtenção do Grau de Doutor**

Área de Concentração:

Epidemiologia

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ MARIA SOARES BARATA

SÃO PAULO

2001

Maria Stela Branquinho

**Estudo da Transmissão de Malária em
população ribeirinha do Estado do Amapá,
Brasil- Sorologia humana e uso de ELISA em
anofelinos.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maria Soares Barata

São Paulo

2001

***Aos meus pais, Ivan e Maria
Augusta, com todo o meu amor.***

***Ao meu querido esposo Luiz
pelo amor e companheirismo,
ao longo de todos estes anos.***

***Aos queridos irmãos Ana e Ivo,
com muito amor.***

Ao querido
Dr. José Maria Soares Barata
Pela orientação e confiança no meu
trabalho

"Tapera do Arraial. Ali, na beira do rio Pará, deixaram largado um povoado inteiro: casas, sobradinho, capela; três vendinhas, o chalé e o cemitério; e a rua, sozinha e comprida, que agora nem mais é uma estrada, de tanto que o mato a entupiu.

Ao redor, bons pastos, boa gente, terra boa para arroz. E o lugar já esteve nos mapas, muito antes da malária chegar.

Ela veio de longe, do São Francisco. Um dia, tomou caminho, entrou na boca aberta do Pará, e pegou a subir. Cada ano avançava um punhado de léguas, mais perto, mais perto, pertinho, fazendo medo no povo, porque era sessão da brava- da "tremeadeira que não desamontava"- matando muita gente"...

Trecho do conto Sarapalha

João Guimarães Rosa

Em especial às Amigas

Ana Maria R.C. Duarte

Izilda Curado

Rosely dos Santos Malafronte

AMIGO É AQUELE QUE CHEGA QUANDO TODO MUNDO JÁ SE FOI

Autor desconhecido

Obrigada

Agradecimentos

Em especial, ao amigo Jaco Voorham pela inestimável colaboração, sem a qual seria impossível realizar este trabalho.

À Sabrina dos Santos Ruiz, amiga de todas as horas pela grande amizade e ajuda no trabalho de campo e na realização dos testes laboratoriais.

À Maura Antonia Porto pela amizade e solidariedade demonstradas, que me foram muito importante e pelo auxílio nos testes sorológicos.

Ao Dr. Almério de Castro Gomes pelo incentivo constante à minha carreira e pelo fornecimento de parte dos peptídeos sintéticos, sem os quais seria impossível realizar este trabalho.

Ao Dr. Heitor F. de Andrade Jr., do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por colocar-me à disposição infraestrutura e reagentes.

Em especial, à Dra. Lígia B. Iversson, pela minuciosa revisão do texto, pelas críticas e sugestões dadas a este trabalho e pelo exemplo de dignidade e competência na esfera científica.

Ao Dr. Cláudio dos Santos Ferreira pela ajuda na parte estatística, pela leitura crítica e pelo exemplo de vida.

Em especial ao Dr. Marcelo Urbano agradeço pela leitura cuidadosa pelas críticas e valiosas sugestões e pelo exemplo de competência e humildade em que muito me espelho.

Ao Dr. Marcos Boulos pela leitura atenta, pela disponibilidade para me ajudar sempre que necessito e pelas sugestões apresentadas que muito contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Dra. Ruth Nussenzweig pelo fornecimento dos hibridomas pelos reagentes e pelo constante incentivo dado a minha carreira.

À Mônica Leal pela ajuda prestada na produção dos anticorpos monoclonais e auxílio sempre que solicitado.

À Dra Júlia Manso pelo valioso treinamento na produção dos anticorpos monoclonais.

Ao amigo Paulo Roberto do Nascimento pela ajuda na tabulação dos dados e na análise epidemiológica.

À amiga-irmã Claudia Barleta do Nascimento pela grande amizade e pelo carinho sempre presente durante os últimos vinte anos.

Ao Almir Robson Ferreira pela confecção dos mapas e pela ajuda oferecida sempre que solicitada.

À Sabrina dos Santos Ruiz e ao Dr. José Maria Soares Barata pela confecção das lindas fotos apresentadas neste trabalho.

À querida cunhada Nanci Leite Branquinho pela grande amizade e pela confecção das tabelas.

À Laurinda Grion, querida cunhada pela revisão minuciosa do português.

Ao Alberto Riccardo Papa pela confecção das imagens e pela presteza sempre que solicitada.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CNPq), Superintendência de Controle de Endemias- SUCEN e Laboratório de Investigação Médica (LIM 49) pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Ao Superintendente da Superintendência de Controle de Endemias- SUCEN Dr. Luiz Jacintho da Silva pelo apoio a este trabalho.

Ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública, representado pelo Dr. Almério de Castro Gomes, pelo empenho para a obtenção de financiamento das passagens e estadias no estado do Amapá.

RESUMO

Branquinho MS. **Estudo da Transmissão de Malária em população ribeirinha do Estado do Amapá, Brasil- Sorologia humana e uso de ELISA em anofelinos**, São Paulo (BR); 2001 [Tese de Doutorado- Faculdade de Saúde Pública da USP].

Objetivo: Caracterizar a transmissão da malária quanto aos vetores e a população humana, em área tipicamente ribeirinha do Estado do Amapá.

Material e métodos. Amostras de sangue de 163 indivíduos residentes em três localidades do Estado do Amapá foram submetidas a testes parasitológicos (gota espessa e esfregaço sangüíneo) e sorológicos (imunofluorescência indireta e ELISA). Na reação de Imunofluorescência indireta usou-se antígeno de formas assexuadas de *Plasmodium vivax* e *P.falciparum* para a pesquisa de imunoglobulinas IgG e IgM. O ELISA foi realizado com peptídeos sintéticos correspondentes à região repetitiva da proteína circunsporozoíta de *P. falciparum*, *P. malariae*; *P. vivax*, *P. vivax* VK247 e *P. vivax*-like. Um total de 9 450 *An. darlingi* e 3.523 *An. albitarsis* foram processados pelo ELISA para a verificação de positividade com os cinco *Plasmodium* acima mencionados.

Resultados. Os testes parasitológicos mostraram 14 indivíduos positivos (7 pelo *P.falciparum*, 6 pelo *P.vivax* e 1 *P.falciparum* + *P.vivax*). As 73 amostras analisadas pela Imunofluorescência Indireta resultaram: *P.falciparum* 30,1% (IgG) e 16,4% (IgM); *P. vivax* 71,2% (IgG) e 13% (IgM). Os resultados no ELISA foram: *P.vivax* 38,4% (28/73), *P.falciparum* 26% (19/73), *P. malariae* 36,7% (27/73), *P.vivax* VK 247 20,5% (15/73) e *P.vivax* like 17,8% (13/73).

O estudo anofélico mostrou a presença do *An. darlingi* e *An. albitarsis* os quais foram positivos para os cinco plasmódios. No *An. darlingi* o *P.vivax* like foi o mais encontrado (1,03%), seguido do *P.vivax* VK247 (0,6%), *P.vivax* (0,12%), *P. falciparum* 0,06% e *P.malariae* 0,04%. No *An. albitarsis* encontrou-se 0,6% de positividade para *P.vivax* like e *P.vivax* VK247.

Discussão. O conhecimento da dinâmica de transmissão com o estabelecimento de adequada incriminação vetorial das espécies de *Plasmodium* circulantes é pré-requisito para o correto direcionamento de estratégias a serem adotadas pelas autoridades de controle. A alta porcentagem de anticorpos presente na população por nós estudada aliada, à presença de casos assintomáticos e o encontro de positividade nos anofelinos mostraram a necessidade do estabelecimento de pesquisas mais sistematizadas nos diferentes quadros brasileiros.

Descritores. Malária. *Anophelinos*. Epidemiologia. ELISA.

SUMMARY

Branquinho MS. **Study of the transmission of Malaria in a riverside population of the State of Amapá, Brazil- Human serum and the use of ELISA in the study of anophelines.** São Paulo (BR); 2001.[Tese de Doutorado- Faculdade de Saúde Pública da USP]

Objective. A description of the transmission of malaria in terms of vectors and human population in a typical riverside area in the State of Amapá.

Material and methods. Blood samples taken from 163 individuals living in three localities in the State of Amapá were submitted to parasitological (thick drip and blood-smear) and serum (indirect immunofluorescence and ELISA) tests. In the indirect immunofluorescence reaction the antigen of asexual forms of *Plasmodium vivax* and *P.falciparum* were used for the research on IgG and IgM immunoglobulin. ELISA was done using the synthetic peptides corresponding to the repetitive region of the circumsporozoitic protein of *P.falciparum*, *P.malariae*, *P.vivax* VK247 and *P.vivax*-like. A total of 9,450 *An. darlingi* and 3,523 *An. albitarsis* were submitted to ELISA to verify positive reaction to the five plasmodia mentioned above.

Results. The parasitological tests presented 14 positive individuals (7 for *P.falciparum*, 6 for *P.vivax* and 1 for *P.falciparum* + *P.vivax*). The 73 samples analyzed by indirect immunofluorescence gave the following results: *P. falciparum* 30,1% (IgG) and 16,4% (IgM); *P. vivax* 71,2%% (IgG) and 13% (IgM). The ELISA results were: *P. falciparum* 26%, *P. vivax* 38,4%, *P.malariae* 36,7%, *P.vivax* VK247 20,5% and *P.vivax* like 17,8%.

The study of the anophelines showed a predominant presence of *An.darlingi* and *An.albitarsis*. which were positive for the five plasmodia studied. In *An.darlingi* the *P.vivax*-like was the most frequently found (1.03%), followed by *P.vivax* VK 247 (90.6%), *P.vivax* (0.12%), *P.falciparum*

(0.06%) and *P.malariae* (0.04%). In *An.albitarsis* a positive reaction of 0.6% was found for both *P.vivax*-like and *P.vivax* VK247.

Discussion. The knowledge of the dynamics of the transmission with the establishment of adequate vectorial incrimination of the circulating species of *Plasmodium* is the fundamental prerequisite for the correct orientation of the strategies to be adopted by the controlling authorities. The high percentage of antibodies present in the population studied, together with the presence of asymptomatic cases and the positive reaction found in the anophelines demonstrated the need for more Brazilian epidemiological scene.

Descriptors:. Malaria. Anophelines. Epidemiology. ELISA.

ABREVIações

A- Adenosina

a.C.- antes de Cristo

D- Ácido aspártico

N- Alanina

An. - *Anopheles*

Ac Mo- Anticorpo monoclonal

AP - Amapá

A- Asparagina

°C - Grau Celsius

BM - Banho Maria

DDT - Dicloro-difenil-tricloreto

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DO - Densidade Óptica

DP - Desvio Padrão

ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FUNASA - Fundação Nacional da Saúde

G- Glicina

Q- Glutamina

IFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

Ker. - *Kerteszia*

M - Molar

MGT - Média Geométrica dos Títulos

μl - Microlitros

Min.- minuto

ml - Mililitros

mg- miligramas

Mm - Milímetros

mm³ - Milímetros cúbicos

N - Norte

Ng- nanogramas

Nys - Nyssorhynchus

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONGs- Organizações não Governamentais

OPAS - Organizacion Pan Americana de La Salud

P.falciparum - Plasmodium falciparum

P.malariae - Plasmodium malariae

P.ovale - Plasmodium ovale

P.vivax - Plasmodium vivax

PBS - Tampão salina fosfato

PCR - Reação em cadeia de polimerase

Prolina - P

Proteína circunsporozoíta - CS

pH- Potencial hidrogeniônico

Rpm - rotação por minuto

S - Sul

TA- Temperatura ambiente

U- Unidade de enzima

W - Oeste

WHO - World Health Organization

REAGENTES EMPREGADOS

Azul de Evans- Sigma E-2129

Aprotinina- Sigma - A 1153

Cloreto de sódio - Merk 6404

Conjugado peroxidase-estreptoavidina e biotina- Calbiochem Diagnost-
213188

Cloreto de amônio (NH₄)Cl, 1M- Sigma A 4514

Antipaina- Sigma- A 6271

Dimetil sulfoxido (DMSO) - Sigma D 5879

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)- Sigma L-4390

Fosfato de Sódio Dibásico- Sigma S0876

Glicerol- Sigma 7893

Imunoglobulina de cabra anti- IgM humana, cadeia gama específica,
marcada com isotiocianato de fluoresceína- Biolab 022010

Imunoglobulina de cabra anti- IgG humana, cadeia gama específica,
marcada com isotiocianato de fluoresceína- Biolab 022009

Imunoglobulina de cabra anti- IgG humana, cadeia gama específica,
marcada com peroxidase- Sigma A8419

Imunoglobulina de cabra anti- IgG de camundongo, cadeia gama específica,
marcada com peroxidase- Sigma A-3673

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução do número de casos de malária notificados no Estado do Amapá, Brasil, 1985-2000. Fonte: (MS/FUNASA, 2000).

Figura 2: Número de casos notificados, por espécie na área de estudo Junho 1998 - Novembro 1999 Fonte: FUNASA/ MS. 2000

Figura 3- Fotografia mostrando uma paisagem típica da localidade de São Raimundo de Pirativa, Amapá, março, 2000.

Figura 4: Fotografia mostrando aspectos da infraestrutura básica de saneamento presente na região do rio Matapí, Amapá, março, 2000.

Figura 5: Fotografia mostrando o meio de transporte utilizado pela Secretaria da Educação do Estado do Amapá na região do rio Matapí-Amapá, março 2000.

Figura 6: Fotografia mostrando uma moradia típica encontrada nas localidades de São Raimundo, Santo Antonio e São João, Amapá, março 2000.

Figura 7: Fotografia de moradores da região do Rio Matapí, estado do Amapá, março 2000.

Figura 8: Distribuição dos títulos das reações de IFI para anticorpos IgG e IgM de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* da população residente na região do rio Matapí, março 2000.

Figura 9: Distribuição das absorbâncias a 414 nm obtidas em ELISA com soros da população de São Raimundo, Amapá - Março 2000.

Figura 10: Distribuição das absorbâncias a 414 nm obtidas em ELISA com soros da população de São João, Amapá - Março 2000.

Figura 11: Distribuição das absorbâncias a 414 nm obtidas em ELISA com soros da população de Santo Antônio, Amapá - Março 2000.

Figura 12 : Distribuição do *An. darlingi* e *An. albitarsis*, capturados em três capturas consecutivas no período de maio a outubro de 1999 na região do rio Matapí, Amapá.

Figura 13: Positividade do *An. darlingi* infectado mensalmente pelo *P. falciparum* (PFT), *P. vivax* (PVT), *P. vivax* VK247 (PKT), *P. vivax/like* (PLT) e *P. malariae* (PMT) pelo ELISA, coletados na região do rio Matapí, Amapá, maio a outubro de 1999.

Figura 14: Positividade do *An. albitarsis* infectado mensalmente pelo *P. falciparum* (PFT), *P. vivax* (PVT), *P. vivax* VK247 (PKT), *P. vivax/like* (PLT) e *P. malariae* (PMT) pelo ELISA, coletados na região do rio Matapí, Amapá, maio a outubro de 1999.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Número de casos de malária nas Américas, 1970 - 1997. Fonte: PAHO 1998.

Tabela 2 :Total de amostras de sangue examinadas e o número de amostras positivas de acordo com o nível de transmissão, 1997 Fonte: PAHO 1998.

Tabela 3: Situação epidemiológica de 21 países com programas ativos de malária, 1997. Fonte: PAHO 1998.

Tabela 4: Número de casos de malária notificados no Brasil, 1990-1998. Fonte: FUNASA 2001.

Tabela 5: Números de casos das doenças de notificação compulsória por trimestre e coeficiente de incidência, Amapá 1999. FONTE: Governo do Estado do Amapá/Secretaria da Saúde/UVE/DE/CVS/SESA-AP, 1999

Tabela 6 - Padronização da reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) com antígenos de formas assexuadas de *P.vivax* e *P.falciparum* para detecção de anticorpos da classe IgG em soros humanos.

Tabela 7. Padronização do teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) com formas assexuadas de *P.vivax* e *P.falciparum* para detecção de anticorpos da classe IgM. Conjugado anti-IgM humano

Tabela 8 :Valores do limiar de reatividade para cinco peptídeos sintéticos, pelo emprego de 30 amostras de soros provenientes do Banco de Sangue de São Paulo.

Tabela 9: Valores do limiar de reatividade para os cinco peptídeos sintéticos, pelo emprego de 30 amostras de soros provenientes de área endêmica de malária, coletados no estado do Amapá.

Tabela 10 : Distribuição por faixa etária e sexo dos indivíduos entrevistados na região do rio Matapi, Amapá, março de 2000.

Tabela 11 : Atividades econômicas desenvolvidas pela população residente na região do rio Matapi, Amapá, março 2000.

Tabela 12 : Positividade pelo teste da gota espessa e esfregaço sangüíneo, com população residente nas localidades de São Raimundo de Piratiba, São João e Santo Antônio, Amapá, março 2000.

Tabela 13: Resultado das parasitemias obtidas no teste da gota espessa da população residente nas localidades de São Raimundo, São João e Santo Antônio, Amapá, março 2000.

Tabela 14 : Prevalência de anticorpos da classe IgG e IgM contra antígenos de formas sangüíneas (assexuadas) de *P.vivax* e *P.falciparum* para o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) com soros das populações de São Raimundo, São João e Santo Antônio, estado do Amapá, março de 2000.

Tabela 15 : Prevalência de anticorpos contra peptídeos relacionados às proteínas CS de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *P.vivax* VK247 e *Plasmodium vivax* like com soros da localidade de São Raimundo, março de 2000.

Tabela 16 : Distribuição do *Anopheles darlingi* e *Anopheles albitarsis*, capturados em três capturas consecutivas no período de maio a outubro de 1999 na região do rio Matapí, Amapá.

Tabela 17: Valores do limiar de reatividade para *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.vivax* VK247 e *P.vivax* like, pelo emprego de 100 exemplares de *An. stephensi* criados em laboratório, não infectados.

Tabela 18 : Positividade do *Anopheles albitarsis* infectado por *Plasmodium falciparum*, *P.vivax*, *P.vivax* VK247, *P.vivax/like* e *P. malariae* pelo ELISA, coletados na região do rio Matapi, Amapá no período de maio a outubro de 1999.

Tabela 19: Positividade do *An. albitarsis* infectado por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. vivax VK247*, *P. vivax/like* e *P. malariae* pelo ELISA, coletados na região do rio Matapi, Amapá no período de maio a outubro de 1999.

ÍNDICE

	Fóginas
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Histórico	1
1.2. A malária no mundo	6
1.3. A malária nas Américas	8
1.4. A malária no Brasil	13
1.5. A malária no Estado do Amapá	17
1.6. Anofelinos relacionados com a transmissão da malária	20
1.7. As variantes do <i>Plasmodium vivax</i>	28
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GERAL	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Delineamento experimental e éticos da pesquisa	35
4.2. Área de estudo	36

4.2.1. Aspectos físicos da região	36
4.2.1.1. Localização	38
4.2.1.2. Clima	43
4.2.1.3. Geomorfologia	43
4.2.1.4. Recursos hídricos	44
4.2.2. Aspectos bióticos da região estudada	46
4.2.2.1. Flora	46
4.2.2.2. Fauna	49
4.2.3. Características sócio- econômicas	52
4.2.3.1. Infra-estrutura básica	52
4.2.3.2. Saúde	54
4.2.3.3. Educação	56
4.2.3.4. Economia	59
4.2.3.5. População e migração	62
4.2.3.6. Participação das Organizações não Governamentais (ONGs) e Associações	66

4.3. Estudo da população humana	69
4.3.1. Coleta das informações epidemiológicas e do sangue venoso	69
4.3.2. Testes Parasitológicos	70
4.3.2.1. Descrição do teste da gota espessa e do esfregaço sangüíneo	70
4.3.3. Testes Imunológicos com os soros humanos	72
4.3.3.1. Padronização e descrição da reação de Imunofluorescência Indireta	72
4.3.3.2. Padronização e descrição do ELISA com os soros humanos	74
4.4. Estudo Entomológico	
4.4.1. Obtenção, identificação e acondicionamento dos anofelinos	79
4.4.2. Detecção da infecção malárica nos anofelinos	80
4.4.3. Padronização e descrição do ELISA com os anofelinos	80
4.4.3.1. Anticorpos monoclonais	80
4.4.3.2. Antígenos utilizados como padrão positivo e negativos e obtenção dos esporozoítas	80
4.4.3.3. Conjugação do anticorpo monoclonal à biotina	82
4.4.3.4. Determinação das concentrações ideais dos anticorpos monoclonais e do conjugado imunoenzimático	83

4.4.3.5. Determinação das concentrações ideais de antígenos (proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos)	84
4.4.3.6. Testes de especificidade	84
4.4.3.7. Determinação do limiar de reatividade do ELISA com anofelinos	85
4.4.4. Descrição do ELISA para anofelinos	85
4.5. Métodos estatísticos	85
5. RESULTADOS	87
5.1. Resultados da população humana	
5.1.1. Resultados das informações epidemiológicas	87
5.1.2. Resultados dos Testes Parasitológicos	
5.1.2.1 Resultados da gota espessa e do esfregaço sangüíneo	91
5.1.3. Resultados dos testes Imunológicos com soros	93
5.1.3.1. Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)	93
5.1.3.2. Resultado do ELISA com os soros humanos	95
5.2. Resultados do estudo entomológico	101

5.2.1. Coleta e identificação dos anofelinos	101
5.2.2. Resultados da padronização do ELISA com os anofelinos	104
5.2.2.1. Determinação das concentrações ideais dos anticorpos monoclonais e do conjugado imunoenzimático	104
5.2.2.2. Determinação das concentrações ideais dos antígenos (proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos)	104
5.2.2.3. Testes de especificidade	105
5.2.2.4.. Determinação do limiar de reatividade no teste ELISA com os anofelinos	105
5.3. Resultados do ELISA com os anofelinos	107
5.3.1. Resultados da infectividade do <i>An. darlingi</i> pelos diferentes plasmódios	107
5.3.2. Resultados da infectividade do <i>An. albitarsis</i> pelos diferentes plasmódios	109
6. DISCUSSÃO	112
7. CONCLUSÃO	127
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

ANEXO I. Ficha de investigação epidemiológica

ANEXO II. Comprovante da aprovação do projeto na Comissão de Ética

Introdução

1.1. Histórico

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, gênero *Plasmodium* (Marchiafava e Celli, 1885), com cerca de 120 espécies que acometem aves, répteis e mamíferos. Quatro delas infectam naturalmente o homem: *P. falciparum* Welch, 1897 *P. vivax* (Grassi e Feletti, 1890), *P. malariae* (Laveran, 1881) e *P. ovale*, Stephens, 1922 (REY 1991).

Embora a origem da malária seja incerta, evidências históricas sugerem a sua existência desde os tempos mais remotos. A presença de febres intermitentes foi referida por diversos povos em diferentes épocas, como os relatos descritos pelos chineses por volta de 2700 a.C., em tijolos na Mesopotâmia datadas de 2000 a.C., nas descrições egípcias de 1570 a.C., assim como em escritos Vedas na Índia (1500 a 800 a .C.). No século IV a.C. Hipócrates, na Grécia, foi o primeiro médico a descrever a doença clinicamente e a estabelecer sua relação com as estações do ano e o local onde as pessoas acometidas pela doença viviam (REY 1991; DEANE 1992).

Ao longo da história, os conhecimentos sobre a malária foram lentos. Somente no século XVII, o missionário peruano Juan Lopes, em 1600, observou que os ameríndios empregavam a casca de uma árvore nativa, conhecida por "casca das febres" para fazer infusões de chá contra as febres. Em 1643, a droga conhecida como "pó dos jesuítas" foi levada para Roma pelo cardeal Juan de Lugo e usada no Hospital Santo Spiritu na cura de soldados, reis e cardeais, espalhando-se a utilização por toda a Europa. A referida árvore foi descrita por Lineu em 1742 e recebeu o nome de cinchona (*Cinchvona ledgeriana*). O quinino, seu princípio ativo, foi isolado em 1820 em Paris por dois franceses, Joseph Caventou e Joseph Pelletier (DEANE 1988).

No século XVIII, a forma de transmissão ainda não era conhecida pelas populações antigas que atribuíam a doença aos "miasmas", que eram as emanações dos pântanos. Daí a origem do termo malária "mal aire" do italiano, e paludismo ou impaludismo, do francês, cuja origem vem de "pallus" que significa água estagnada (REY 1991).

Avanços significativos relativos aos conhecimentos da malária surgiram a partir de 1880 quando Charles Louis Alphonse Laveran, médico do exército francês na Argélia observou pela primeira vez o agente etiológico no interior dos glóbulos vermelhos humanos, verificando pigmentos pretos nas hemácias e em órgãos necropsiados de soldados mortos pela doença. O médico inglês Ronald Ross, em 1897, trabalhando na Índia, elucidou o mecanismo de transmissão natural da doença, por meio da observação do parasita em mosquitos. Em 1889, o cientista Batista Grassi, identificou o *Anopheles* como sendo o transmissor da malária (KNELL 1991; DUTRA 2001).

A partir de então, iniciaram-se as primeiras medidas de controle voltadas basicamente ao estabelecimento de obras de saneamento básico, por meio de drenagem de córregos, rios e construções de aterros sanitários. Foram introduzidas com estas obras substâncias químicas formadas de compostos de arsênio, o denominado verde-paris, e derivados de petróleo nos criadouros visando à eliminação da fase larvária dos insetos (REY 1981; DUTRA 2001).

Alguns conflitos bélicos ocorridos ao longo da história exerceram influência sobre a pesquisa da malária. A necessidade de aquisição de quinino pelas tropas alemãs na Primeira Guerra Mundial incentivou o desenvolvimento de drogas sintéticas como a pamaquina (1924), mepacrina (1930) e cloroquina (1934). Outro marco na pesquisa da doença foi a síntese do composto de ação residual, dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) em 1942, por Paul Muller na Suíça, de baixo custo e grande poder inseticida (DUTRA 2001; Di SANTI e BOULOS 1999).

Com o advento do DDT, que se mostrou altamente eficiente na eliminação dos insetos transmissores, aliado à disponibilidade de drogas antimaláricas, surgiu a idéia de que a doença pudesse ser erradicada do mundo. Em 1955, o conceito de erradicação foi adotado na Assembléia Mundial de Saúde e dois anos depois foram lançadas as estratégias que seriam adotadas na Campanha Global de Erradicação da Malária. O programa de erradicação apresentou as seguintes etapas:

- Fase preparatória: procedeu-se a identificação das áreas malarígenas e dos imóveis possíveis de serem borrifados com DDT,

- Fase de ataque: constituída pela cobertura total da área em termos de diagnóstico parasitológico dos indivíduos sintomáticos, tratamento dos doentes, borrifação semestral dos imóveis com DDT e aplicação de medidas de controle nos criadouros dos mosquitos (obras de drenagem e aplicação de larvicidas),

- Fase de consolidação: esta etapa era mantida por quatro anos nas áreas cuja incidência se mantivesse em níveis baixos (um caso em 100 habitantes) e em que não fossem notificados casos autóctones,

- Fase de manutenção: iniciava-se nas áreas cuja interrupção da borrifação com DDT nas casas tinham cessado por no mínimo três anos consecutivos e com ausência de casos de malária. Mantinham-se ações de vigilância epidemiológica pelos sistemas de saúde locais (DUTRA 2001).

Os esforços empregados durante esta campanha contribuíram para que, no final da década de 60 houvesse diminuição de cerca de 53% da transmissão da malária em algumas áreas como Américas, Ásia, Sul e Sudeste da Europa. Infelizmente em 1970 houve recrudescimento da doença, sobretudo, pela diminuição das atividades de controle por motivos de ordem econômica, administrativa e técnico-operacional. Além dos fatores de ordem biológica como o aparecimento da resistência dos anofelinos aos inseticidas e dos plasmódios aos quimioterápicos.

Assim, foi preciso rever as estratégias globais, substituindo-se as ações então direcionadas à erradicação por ações de controle. Nesta etapa, deu-se importância à realidade epidemiológica e social das populações locais, assim como aos fatores de ordem social, econômicos, culturais e ecológicos, além da participação ativa da população (WERNSDORFER 1980; BRUCE-CHWATT 1985).

A elevação do número de casos ocorridos em várias regiões do mundo fez com que técnicos da OMS realizassem uma Conferência Ministerial de Malária em outubro de 1992, em Amsterdã, Holanda, para elaboração de normas técnicas a serem adotadas em áreas de risco. Implantou-se a Declaração Mundial de Controle da Malária e uma Estratégia Global de Controle visando à redução da morbidade, prevenção da mortalidade, assim como diminuição do impacto sócio-econômico causado pela moléstia, com base na manutenção dos seguintes pontos (WHO 1992):

- Diagnóstico precoce e tratamento rápido,
- Planejamento e implementação de medidas preventivas e seletivas, incluindo-se o controle dos vetores,
- Detecção, controle e prevenção de epidemias,
- Reforço da capacidade local em desenvolvimento de pesquisa básica e aplicada para permitir e promover avaliações regulares da situação da malária em nível nacional.

Em 1995, a Organização Mundial da Saúde com agências das Nações Unidas e Conselho Econômico das Nações Unidas implantaram a Estratégia Global para o período compreendido de 1995 a 2000, por intermédio da elaboração de um Plano de Ação para o Controle da Malária, cujo objetivo está centrado em:

- Colaborar com os países no que diz respeito às prioridades e necessidades locais,
- Reforçar a capacidade local por intermédio de pesquisa operacional e da realização de treinamentos e reciclagens,
- Integrar as atividades do controle da malária aos demais programas da área da saúde.

O objetivo principal deste plano foi que ocorresse até o ano 2000 a redução da mortalidade da malária em 20% em relação a 1995, em 75% dos países endêmicos da África Subsaariana.

1.2. A malária no mundo

O risco de os indivíduos contraírem a malária é bastante elevado em várias regiões mundiais, em razão de aproximadamente 2.400 milhões de pessoas viverem em áreas propícias a sua instalação. Segundo dados da OMS, a malária é endêmica em 53 países na África, 21 nas Américas, quatro na Europa, 14 na Região Leste do Mediterrâneo, oito ao Sudeste da Ásia, e nove a Oeste do Pacífico (WHO 1996a). De acordo com o local de residência, as características epidemiológicas e o número de casos, as áreas malarígenas no mundo podem estar subdivididas em:

Áreas sem transmissão, onde nunca foram detectados casos da doença, ou em áreas cuja erradicação foi estabelecida,

Áreas malarígenas, que compreendem regiões onde a doença mantém-se endêmica ao longo dos anos ou onde se conseguiu uma diminuição da incidência, porém a transmissão é mantida.

A malária é uma enfermidade que atinge as populações mais empobrecidas do planeta. Estima-se a ocorrência de 300 milhões a 500 milhões de casos clínicos e cerca de 1,5 milhões a 2,7 milhões de óbitos a cada ano, a maioria em crianças abaixo de cinco anos de idade. Aproximadamente 80% da morbidade e 90% da mortalidade da doença ocorrem na África. (WHO 1996a).

A mortalidade em razão da doença é extremamente elevada, segundo dados da OMS a malária mata uma criança a cada 30 segundos em regiões rurais da África, onde o acesso aos serviços de saúde é deficiente. Em números absolutos, isto significa a morte de 3 mil crianças por dia. Pesquisas realizadas em Gâmbia, Gana, Quênia e Burkina Faso demonstram que aproximadamente 30% dessas mortes poderiam ser evitadas utilizando-se medidas de controles simples como o emprego de mosquiteiros impregnados com inseticida (WHO 2000).

A subnotificação dos casos é um problema constante em todos os países atingidos pela malária. Um exemplo é o Afeganistão no qual, em 1991, a prevalência da doença foi de 298 mil casos notificados, porém estima-se de 2 milhões a 3 milhões de casos por ano (WHO 1996b) . A tendência de elevação da incidência neste país é esperada, devido ao conflito bélico que atualmente o assola.

Estima-se que o número real de casos na Índia gire em torno de 18 milhões, o que corresponderia a 40% da malária ocorrida em países não africanos, 40% dos quais pelo *P. falciparum*. No Sri-Lanka o número de casos também foi bastante alto em 1993, atingindo cerca de 360 mil casos e 1,4 milhão subnotificados. No mesmo ano, estimativas de indivíduos positivos e de óbitos no Camboja foram 600 mil e 10 mil, respectivamente. Outros países como Papua-Nova Guiné, Filipinas, Ilhas Salomão, Tailândia e Vietnã apresentaram 510 mil, 65 mil, 126 mil, 99 mil e 156 mil, respectivamente, 71% causados pelo *P. falciparum*, o que denota a elevação da prevalência em países não pertencentes à comunidade africana (WHO 1996c).

Os prejuízos de ordem econômico-sociais atribuídos à doença foram mensurados por um grupo de pesquisadores na região subsaariana, onde se verificou que os custos empregados na área hospitalar e nas atividades de controle atingiram valores excedentes a 2 bilhões de dólares por ano (WHO 2000), além do custo decorrente do absenteísmo ao trabalho e na escola, que a curto prazo são difíceis de ser avaliados, porém afetam sobremaneira as comunidades abrangidas pela doença.

1.3. A malária nas Américas

A Organização Mundial da Saúde e Organização Panamericana de Saúde elaboraram nos últimos anos um Plano de Estratégia Global para o Controle da Malária (EGCM) (PAHO 1998), para ser desenvolvido nas Américas. Desse modo os países participantes estão redefinindo suas áreas malarígenas sob a base de diferentes riscos de exposição à doença que são:

- Fatores relacionados com os processos migratórios das populações para áreas de transmissão,
- Adoção de mudanças de hábitos por parte da população de risco, seja em nível individual ou coletivo visando à proteção contra os vetores,
- Acesso da população ao diagnóstico e tratamento precoces.

Dados epidemiológicos de 1997 demonstram que a população estimada das Américas naquele ano era de 794 milhões de habitantes, dos quais 307 milhões viviam em áreas ecologicamente propícias à transmissão da doença (tabela 1). Dentre os 37 países membros da OMS/OPS, 21 apresentaram transmissão ativa da doença. São eles: Equador, Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Haiti, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela (PAHO 1998).

Tabela 1**Número de casos de malária nas Américas, 1970 – 1997****(EM MILHARES)**

**HABITANTES EM ÁREAS ECOLOGICAMENTE PROPÍCIAS
PARA A TRANSMISSÃO DE MALÁRIA**

RISCO DE TRANSMISSÃO DE MALÁRIA

ANO	Alto	Médio	Baixo	TOTAL	TOTAL DE CASOS DE MALÁRIA
1970	80,770	59,807	40,518	181,257	505,819
1971	81,306	60,396	43,644	185,492	513,544
1972	86,634	61,645	42,016	190,448	524,774
1973	87,969	61,915	45,535	195,528	535,109
1974	91,527	63,130	46,042	200,755	544,865
1975	99,405	61,834	44,633	205,872	555,676
1976	101,068	61,205	48,813	211,086	565,249
1977	104,567	60,373	50,610	215,550	576,942
1978	105,611	54,808	59,734	220,153	587,004
1979	113,092	55,989	57,280	226,361	600,263
1980	114,620	58,656	58,087	231,366	610,021
1981	117,042	62,256	59,962	239,260	627,375
1982	118,338	64,941	62,028	245,307	635,954
1983	119,175	63,182	66,970	249,327	639,212
1984	124,408	64,496	68,372	257,276	659,535
1985	124,086	68,659	67,092	259,837	665,777
1986	116,143	103,500	43,717	263,371	662,983
1987	117,310	108,633	42,334	268,277	672,384
1988	124,250	109,927	46,048	280,225	703,385
1989	126,666	113,419	45,309	285,394	715,994
1990	120,980	110,139	47,481	278,600	698,199
1991	143,239	71,381	66,504	281,124	721,256
1992	134,089	51,974	103,885	289,948	725,564
1993	202,329	46,225	41,030	289,584	739,561
1994	160,947	37,409	32,967	231,323	763,305
1995	169,643	42,454	36,881	248,978	774,712
1996	210,519	46,277	41,332	298,128	786,055
1997	221,341	30,822	54,358	306,521	793,582

Fonte: PAHO (1998).

A partir da análise do número de casos notificados nas Américas em 1997, indicado na Tabela 2, verifica-se que o Brasil apresentou o maior número absoluto, equivalente a 36,0% do total, correspondente a praticamente toda a região Andina, que totaliza 43,0% dos casos.

TABELA 2

**TOTAL DE AMOSTRAS DE SANGUE EXAMINADAS E O NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS
DE ACORDO COM O NÍVEL DE RISCO DE TRANSMISSÃO, 1997**

PAÍSES E TERRITÓRIOS	TOTAL		BAIXO RISCO DE TRANSMISSÃO		MODERADO RISCO DE TRANSMISSÃO		ALTO RISCO DE TRANSMISSÃO		ÁREAS SEM MALÁRIA	
	AMOSTRAS EXAMINADAS	POSITIVAS	AMOSTRAS EXAMINADAS	POSITIVAS	AMOSTRAS EXAMINADAS	POSITIVAS	AMOSTRAS EXAMINADAS	POSITIVAS	AMOSTRAS EXAMINADAS	POSITIVAS
CANADÁ	-	1 006	-	-	-	-	-	-	-	1 006
CUBA	171 763	34	-	-	-	-	-	-	171 763	34
CHILE	10	10	-	-	-	-	-	-	10	10
BARBADOS	-	4	-	-	-	-	-	-	-	4
DOMINICA	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GRANADA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GUADALUPE	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3
JAMAICA	102	10	-	-	-	-	-	-	102	10
MARTINICA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PORTO RICO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SANTA LUCIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
TRINIDADE E TOBAGO	17 228	6	-	-	-	-	-	-	17 228	6
ESTADOS UNIDOS	1 265	1 265	-	-	-	-	-	-	1 265	1 265
URUGUAI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ILHAS VIRGENS(EUA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SUBTOTAL	190 378	2 338	0	0	0	0	0	0	190 368	2 339
MÉXICO	1 950 935	5 046	284 189	31	552 136	737	1 144 610	4 277	-	1
BELICE	26 598	4 014	0	0	7 669	486	18 929	3 528	-	-
COSTA RICA	155 925	4 712	2 809	55	134 120	2 757	18 996	1 711	-	189
EL SALVADOR	166 895	2 719	24 830	231	25 552	209	104 889	2 244	11 624	35
GUATEMALA	140 113	32 099	24 469	2 534	47 963	9 063	67 198	20 378	483	124
HONDURAS	300 063	65 863	38 995	3 101	20 381	3 620	240 687	59 142	-	-
NICARAGUA	410 132	42 819	35 280	1 079	87 673	5 669	287 179	36 071	-	-
PANAMA	193 853	505	42 232	73	151 621	432	-	-	-	-
HAITI	69 853	18 877	-	-	-	-	-	-	-	-
REP. DOMINICANA	446 874	816	378 190	408	68 684	408	-	-	-	-
GUIANA FRANCESA	42 631	3 195	-	81	1 501	12	26 207	2 902	-	200
GUIANA	229 710	32 103	-	-	-	-	-	-	-	-
SURINAME	94 508	11 323	-	-	-	-	-	-	-	-
BRASIL	1 869 382	392 976	393 998	23 661	401 934	87 511	1 072 963	281 670	487	134
BOLÍVIA	141 804	51 478	0	0	33 193	12 056	108 611	39 422	-	-
COLOMBIA	582 309	180 898	15 613	924	62 237	22 156	504 459	157 824	-	-
EQUADOR	174 692	16 365	6 225	1 454	74 963	4 869	93 504	10 052	-	-
PERU	1 528 004	183 740	60 327	2 661	406 818	25 243	1 057 973	115 435	2 886	401
VENEZUELA	271 989	22 400	9 582	558	30 230	1 608	231 588	20 212	589	22
ARGENTINA	9 684	592	4 033	83	-	-	5 610	468	-	-
PARAGUAI	41 667	567	3 558	6	1 758	3	36 111	553	250	5
21 PAÍSES SUBTOTAL	8 847 621	1 073 107	1 324 330	36 934	2 078 433	176 829	5 019 514	755 889	16 319	1 111
TOTAL	9 037 999	1 075 445	1 324 330	36 934	2 078 433	176 829	5 019 514	755 889	206 687	3 450

FONTE: PAHO (1998)

TABELA 3

SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE 21 PAÍSES					
COM PROGRAMAS ATIVOS DE MALÁRIA, 1997					
PESSOAS EM RISCO			ESPÉCIES PARASITÁRIAS		
PAÍSES POR SUB-REGIÃO GEOGRÁFICA	POPULAÇÃO EM ÁREAS COM MALÁRIA*	EXAMINADAS	<i>P. falciparum e associada</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>
MÉXICO	20.392	1.666.746	65	4.949	0
BELICE	230	26.598	123	3.888	0
COSTA RICA	932	153.116	40	4.428	0
EL SALVADOR	2.257	127.244	2	2.431	0
GUATEMALA	4.958	115.161	859	28.690	0
HONDURAS	3.831	261.068	741	62.021	0
NICARÁGUA	2.221	373.982	1.805	48.556	0
PANAMÁ	315	136.628	167	265	0
HAITI **	7.395	69.853	18.877	0	0
REP. DOMINICANA	227	68.684	408	0	0
GUIANA FRANCESA	14	27.708	2.180	591	130
GUIANA	449	229.710	18.238	11.865	0
SURINAME	36	94.508	9.251	1.125	245
BRASIL	7.468	1.474.897	90.146	277.891	1.144
BOLÍVIA	3.166	141.804	5.381	46.097	0
COLÔMBIA	14.629	566.696	66.094	113.781	105
EQUADOR	2.944	168.467	2.854	12.057	0
PERU	11.112	1.464.791	52.913	124.324	35
VENEZUELA	926	261.818	4.063	17.693	64
ARGENTINA	245	5.610	0	592	0
PARAGUAI	1.440	37.849	1	555	0
TOTAL	85.187	7.472.938	274.208	761.799	1.723

* POPULAÇÃO (MILHARES)- ÁREAS COM RISCO MODERADO E ALTO

** NÃO HÁ INFORMAÇÃO DISPONÍVEL PARA 1997

Fonte: PAHO 1998.

1.4. A malária no Brasil

Nas décadas de 20 e 30, iniciou-se o emprego das primeiras medidas mais sistematizadas de controle da malária no Brasil. As ações envolviam aplicação de inseticidas de ação não residual (piretro) nas moradias, incentivo ao uso de mosquiteiros pela população exposta, telagem das residências e o uso dos antimaláricos atebrina e plasmoquina (FUNASA 1995).

Em 1930, ocorreu um surto epidêmico de malária na cidade de Natal, no Rio Grande do Norte, quando esta foi infestada pelo *An. gambiae*, proveniente da África. Em poucos dias gerou-se uma grande epidemia. Foi então criado o Serviço de Malária do Nordeste, que por meio de um intenso trabalho eliminou o anofelino do país. Graças ao bom desempenho deste órgão, em 1941 foi inaugurado o Serviço Nacional de Malária, que visava ao controle da endemia em todo o território nacional.

A criação deste órgão foi extremamente importante nesta época, visto que a prevalência estimada na década de 1940 passou de 6 milhões de casos anuais para 52.469 casos em 1970 (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1992).

Seguindo a tendência mundial, houve uma significativa elevação da incidência da malária no Brasil a partir da década de 70, coincidindo com o período em que foram elaboradas propostas governamentais para explorar os recursos naturais da região amazônica, na tentativa de sua integrá-la às demais regiões brasileiras (MARQUES e GUTIERREZ 1994)

A região amazônica brasileira corresponde ao principal pólo de disseminação da doença nas Américas, suas alterações ao longo dos anos propiciaram profundas modificações nos padrões de distribuição populacional e introduziram doenças restritas a determinadas áreas (McGREVY et. al 1989; CASTILLA et. al 1993; SAWYER 1993).

Com a intensificação dos processos migratórios, nos quais grandes contingentes populacionais dirigiram-se para a região Norte do país em

busca de melhores condições econômicas, a maioria atraída pelos projetos de colonização, agropecuários, mineração, extração de madeira, construção de hidrelétricas e demais atividades relacionadas com o desmatamento da floresta, o aumento de casos da doença foi inevitável nos últimos anos (TAUIL 1984; MARQUES 1986, 1987, 1993; CAMARGO et. al 1994).

Em 1970, foi criada a Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) para dar continuidade a programas de erradicação de várias doenças, incluindo-se a malária. A instituição passou a atuar em todas as regiões malarígenas do País, que foram então subdivididas em áreas de erradicação a longo e curto prazos.

A área de erradicação a longo prazo correspondia à Amazônia Legal com cerca de 5 milhões km², ocupava aproximadamente 60% do território nacional. Esta área abrangia os atuais Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins e parte ocidental do Maranhão. A área de erradicação a curto prazo compreendia os Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Santa Catarina, São Paulo e Sergipe (TAUIL 1986; MARQUES 1993).

Atualmente, o programa de controle da malária é realizado pela Fundação Nacional da Saúde (FUNASA) e tem como objetivo geral a redução da morbidade e mortalidade. A FUNASA segue o Plano de Intensificação das Ações de Controle de Malária na Amazônia Legal (FUNASA 2000), estratégia que vem sendo aplicada em 254 municípios da região amazônica brasileira e visa atingir os seguintes objetivos:

- Redução da morbidade da doença em níveis sustentáveis,
- Redução do surgimento de epidemias localizadas,
- Redução da gravidade da doença e, conseqüentemente, do número de óbitos,

- Manutenção de ações articuladas voltadas às áreas indígenas juntamente com os Distritos Sanitários Indígenas,
- Manutenção das ações conjuntas com o Departamento de Engenharia de Saúde Pública da FUNASA,
- Introdução de controle seletivo de vetores em todos os municípios,
- Garantia de fornecimento de diagnóstico e tratamento precoce à população. Tais procedimentos atuam diretamente em sua cadeia de transmissão, interrompendo o ciclo de reprodução sangüínea do parasita, responsável pelas manifestações clínicas, e eventuais complicações da doença. Impedem ainda as recidivas e a eliminação dos gametócitos,
- Manutenção do Sistema de Informação em malária,
- Eliminação da transmissão em áreas urbanas.

A proposta governamental inclui a descentralização das ações de controle, onde os recursos financeiros são transferidos diretamente do nível federal aos fundos estaduais e municipais, estabelecendo um fluxo mais rápido, para evitar a descontinuidade das ações (FUNASA 1999). No atual plano, as estratégias de atuação são divididas em duas áreas:

Área amazônica: onde o controle se impõe por meio de mecanismos ágeis e flexíveis, com atividades capazes de identificar, delimitar e caracterizar as inúmeras situações de transmissão existentes na área; estabelecendo os níveis de controle e os objetivos a serem perseguidos em cada caso. Além desses pontos, o programa prevê o desenvolvimento da capacidade de articulação com instituições públicas e/ou privadas e outros setores do governo.

Área extra-amazônica: visa ao estabelecimento e manutenção das atividades de vigilância definindo a vulnerabilidade e a receptividade das

diferentes regiões e garantindo diagnóstico e tratamento precoces aos pacientes.

Tabela 4. Número de casos notificados de malária no Brasil, no período de 1990 a 1998

Espécies										
	<i>P.vivax</i>		<i>P.falciparum</i>		<i>Pv+Pf</i>		<i>P.malariae</i>		Total	
Ano	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%
1990	328.184	55,0	248.207	44,3	21	0,00	3.984	0,7	560.396	100,0
1991	323.175	59,6	214.988	39,7	108	0,02	3.656	0,7	541.927	100,0
1992	331.870	57,5	241.271	41,8	158	0,03	3.799	0,7	577.098	100,0
1993	307.060	63,4	173.259	35,8	212	0,04	3.604	0,8	484.135	100,0
1994	370.354	65,1	193.057	34,0	146	0,02	4.754	0,8	568.311	100,0
1995	361.559	63,9	199.531	35,3	765	0,10	3.891	0,7	565.746	100,0
1996	311.208	70,4	128.418	28,9	1.573	0,40	2.850	0,6	444.049	100,0
1997	305.493	75,4	95.439	23,6	1.077	0,30	3.042	0,7	405.051	100,0
1998	364.435	77,2	102.719	21,8	1.512	0,30	3.226	0,7	471.892	100,0

Fonte: FUNASA 2001.

O número de casos positivos de malária no ano 2000 foi 611.042, sendo 522.683 provenientes da região Norte. Dentre os estados que compõem esta região, os que apresentaram maior prevalência foram o Pará (278.203), seguido pelo Amazonas (96.026) e Rondônia (54.074) (FUNASA 2001).

A região Nordeste apresentou 79.386 casos, sendo o Maranhão o responsável por 78.817 casos. No Sudeste, foram notificados 647 casos, no Sul, 230 e no Centro-Oeste, 8.036 casos.

1.5. A malária no Estado do Amapá

O Governo do Amapá, por meio de projetos de sustentabilidade da economia local, busca um equilíbrio entre os aspectos econômicos, sociais e ambientais. A agregação desses valores às atividades agrícolas e florestais com a pesca e a mineração fortalecem a dinâmica local e regional, gerando e distribuindo os recursos financeiros e fixando a população nos locais de origem.

Apesar desta prática, a morbidade, das diversas doenças incluindo-se a malária, é elevado, conforme demonstram os dados de 1999 (Tabela 5). Entre as principais doenças de notificação compulsória que acometeram a população do Estado, a malária foi a que apresentou a maior prevalência.

A figura 1 mostra a evolução do número de casos de malária notificados no Estado do Amapá, Brasil, 1985-2000.

TABELA 5

NÚMEROS DE CASOS DAS DOENÇAS DE NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA POR TRIMESTRE E COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA, AMAPÁ, 1999.

AGRAVOS	1º Trim	2º Trim	3º Trim	4º Trim	TOTAL	C.I.
AIDS	13	9	-	5	27	6,13
CÓLERA	-	-	-	-	-	-
COQUELUCHE	4	4	5	3	16	3,63
DENGUE	-	-	-	-	-	-
DIFTERIA	-	-	-	-	-	-
DST	706	838	584	640	2.768	629,40
DOENÇA DE CHAGAS	-	-	-	-	-	-
FEBRE AMARELA	-	-	-	-	-	-
FEBRE TIFÓIDE	5	20	7	2	34	7,73
HANSENÍASE	45	42	35	31	153	34,79
HEPATITE A	127	248	151	147	673	153,03
HEPATITE B	10	16	26	33	85	19,32
HEPATITE C	4	11	21	36	72	16,37
HEPATITE NÃO ESPECÍFICA	6	15	16	27	64	14,55
LEPTOSPIROSE	88	57	193	100	438	99,59
LTA	66	189	94	132	481	109,37
MALÁRIA	2.939	2.049	8.962	13.180	27.130	6168,97
MENINGITE POR HEMOFILOS	4	2	2	1	9	2,04
MENINGITE MENINGOCICA	1	-	2	-	3	0,68
MENINGITE PNEUMONIA	-	2	2	-	4	0,90
MENINGITE NÃO ESPECÍFICA	6	9	6	2	23	5,22
POLIOMIELITE	-	-	-	-	-	-
RAIVA HUMANA	-	-	-	-	-	-
RUBÉOLA	6	26	60	66	158	35,92
RUBÉOLA CONGÊNITA.	-	-	3	-	3	0,68
SARAMPO	-	-	-	-	-	-
TÉTANO ACIDENTAL	-	2	1	3	6	1,36
TÉTANO NEONATAL	-	-	-	1	1	0,22
TUBERCULOSE	62	63	44	39	208	47,29
ACS. P/ ANIM. PEÇON.	86	63	51	54	254	57,75
TOXOPLASMOSE	3	7	7	6	23	5,22

FONTE: Governo Do Estado do Amapá/Secretaria da Saúde/UBE/DE/ CVS/ SESA-AP 1999.

Não houve registro de casos (-).

L.T.A. (Leishmaniose tegumentar americana).

DST (Doenças sexualmente transmissível).

Acs. P/ anim. Peçon (acidentes por animais peçonhentos).

Figura 1

Figura 1: Evolução do número de casos de malária notificados no Estado do Amapá, Brasil, 1985-2000. Fonte: (MS/FUNASA 2000).

Figura 2

Figura 2. Número de casos notificados, por espécie na área de estudo Junho 1998 - Novembro 1999 Fonte: FUNASA/ MS. 2000 (gráfico elaborado por Jaco Voorham)

1.6. Anofelinos relacionados com a transmissão da malária

A transmissão da doença de forma natural para o homem ocorre pela picada do mosquito pertencente à ordem Díptera, família Culicidae, subfamília Anophelinae, tribo Anophelini, do gênero *Anopheles*. Na natureza são encontradas aproximadamente 400 espécies, porém cerca de 60 são consideradas boas vetoras da malária (BRUCE-CHWATT 1985; CONSOLI e OLIVEIRA 1994).

No continente africano o *An. (Mys) gambiae*, *sensu strictu* Giles, 1902 e o *An. (Mys) funestus* Giles, 1900 são os principais transmissores da malária, ao lado de espécies pertencentes ao complexo *gambiae*, como o *An. arabiensis*, Patton, 1905 (DAVID 1991; SNOUNOU et. al 1993; COLLINS e BESANSKY 1994; CONSTANTINE et. al 1996; ELISSA et. al 1999).

Cabe ressaltar, conforme foi mencionado anteriormente, que aproximadamente 90% dos casos da malária mundial ocorrem na África, totalizando valores entre 270 milhões e 480 milhões de pessoas acometidas pela doença a cada ano. Assim, é primordial a implementação de estudos entomológicos nos países africanos.

Em relação à distribuição anofélica nas Américas, GUIMARÃES (1997), relata os seguintes subgêneros *Anopheles*. Meigen: *Nyssorhynchus* (28 espécies), *Kerteszia* (12 espécies), *Lophopodomyia* (6 espécies), *Stethomyia* (5 espécies) e *Anopheles*. (46 espécies). As espécies capazes de transmitir a malária pertencem aos Subgêneros: *Nyssorhynchus*, *Anopheles* e *Kerteszia*

O *An. darlingi* Root, 1926, é a espécie mais amplamente encontrada desde o México até a Argentina, nas áreas de baixas altitudes como: no leste dos Andes, Colômbia, Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai, Argentina, Brasil e Guianas; no oeste dos Andes, somente na Colômbia. Nas áreas centro-americanas, foi encontrado em Belize, Honduras e Guatemala (CONSOLI e OLIVEIRA 1994).

Outra espécie importante é *An. (Nys) aquasalis* Curry, 1932, presente numa faixa que vai do município de Peruíbe em São Paulo até a Costa Rica, beirando o Oceano Atlântico. Daí segue até o Golfo de Guaiaquil, no Equador, no Oceano Pacífico. A espécie é encontrada nas Antilhas, em Trinidad e Tobago (CONSOLI e OLIVEIRA 1994).

Destacam-se *An. (Nys) albimanus* Wiedemann, 1821, encontrado no México, Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá, Colômbia, República Dominicana e Equador; *An. (Nys) nuneztovari* Galbadón, 1940, está presente na Colômbia e Venezuela; *An. (Nys) pseudopunctipennis* Theobald, 1901, na Bolívia, Panamá, Nicarágua, México, Peru, e Argentina e *An. (Ker) bellator* Dyar e Knab, 1906, na Venezuela, nas Guianas e Trinidad e Tobago, sendo também importantes vetores da endemia (RODRIGUEZ et. al 1992; RUBIO-PALIS 1992a; LOYOLA et. al 1993; SEGURA 1998).

No Brasil, foram encontradas 54 espécies pertencentes ao subgênero *Anopheles*. Meigen: *Nyssorhynchus*, *Kerteszia*, *Lophopodomys*, *Stethomyia* e *Anopheles*. Somente os *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* são capazes de transmitir a malária humana (GUIMARÃES 1997).

Apesar da distribuição dos anofelinos ter sido relatada por vários autores ao longo dos anos DEANE (1948, 1986, 1988, 1989); TADEI et. al (1988, 1993); LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et. al (1989); OLIVEIRA-FERREIRA et. al (1990); ROCHA e MASCARENHAS (1994); ROCHA (1996); ROSA-FREITAS (1998), entre outros, faz-se necessária a realização de uma carta anofélica para o mapeamento das regiões malarígenas brasileiras.

Em relação ao subgênero *Kerteszia*, as principais espécies encontradas no Brasil são *An. (Kerteszia) cruzii*, Dyar e Knab 1908 e *An. (Kerteszia) bellator* Dyar e Knab, 1906b, são espécies neotropicais, com ampla distribuição na costa brasileira.

An. (Kerteszia) cruzii é antropofílico de hábitos predominantemente exofílicos, encontrado em ambientes da mata. Apresenta atividade ao longo

An. (Kerteszia) cruzii é antropofílico de hábitos predominantemente exofílicos, encontrado em ambientes da mata. Apresenta atividade ao longo das 24 horas do dia, com picos nos períodos crepusculares e suas formas larvárias desenvolvem-se em águas depositadas nos áxeis das bromeliáceas (FORATTINI et. al 1987; TUBAKI 1993). A espécie é o único vetor natural conhecido de malária simiana no Brasil e nas Américas, que veicula o *P. brasilianum* e o *P. simium*, tendo sido também encontrado infectado com o *P. vivax* clássico e com o *P. vivax* VK 247 (DEANE 1986; BRANQUINHO et. al 1996).

No subgênero *Nyssorhynchus*, as espécies encontradas infectadas com plasmódios no Brasil são: *An. darlingi* Root 1926, que apresenta elevado grau de antropofilia (TADEI et. al 1986; 1987), acentuada adaptação às diferentes condições ambientais (TADEI 1987a; TADEI e SANTOS 1987), além de grande capacidade de reprodução em diferentes habitats (DEANE 1986). Desde a década de 30, a espécie vem sendo considerada a responsável pela deflagração da endemia no território nacional, sendo altamente susceptível aos plasmódios (CONSOLI e OLIVEIRA 1994).

An. aquasalis Curry, 1932, apresenta preferência por águas com altos teores de salinidade, além de ser geralmente encontrado em coleções hídricas paradas de pequeno ou médio porte, transitórias ou semipermanentes, ensolaradas ou parcialmente sombreadas, características estas presentes em áreas de baixadas litorâneas (CONSOLI e OLIVEIRA 1994). SUCUPIRA et. al (2001) no Estado do Pará, encontraram positividade de 1,19% da espécie para *P. falciparum*, *P. vivax* 210 e *P. vivax* VK247

An. albitarsis Lynch-Arribálzaga, 1878, é um complexo formado por quatro espécies, incluindo *An. deaneorum*, Rosa Freitas (1989), *An. albitarsis sensu strictu*, Lynch-Arribálzaga (1878); *An. marajoara* Galvão e Damasceno 1942b, e *An. albitarsis* sp (ROSA- FREITAS et. al 1990; WILKERSON et. al 1995).

Este anofelino apresenta grandes variações moleculares e/ou bioquímicas, além de comportamentais que podem acarretar enorme heterogeneidade em termos de capacidade vetorial (DEANE 1986; KLEIN et. al 1991a,b;1990; CONSOLI e OLIVEIRA 1994; FORATTINI et. al 1994 ROSA-FREITAS et. al 1998; SANTOS 2001).

Outras espécies pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus* que vêm sendo incriminadas como potencialmente vetoras da malária são *An. oswaldoi*, Peryassú (1922), *An. nuneztovari*, Galbaldon (1940) e *An. triannulatus*, Neiva e Pinto (1922). Estas espécies apresentam variações comportamentais que podem exercer influências diretas em termos de capacidade vetorial, sendo até o momento consideradas espécies secundárias na transmissão da malária no Brasil (ARRUDA et. al 1986; DEANE 1986; LOURENÇO- DE- OLIVEIRA et. al 1989; OLIVEIRA-FERREIRA et. al 1990; CONSOLI e OLIVEIRA 1994; BRANQUINHO et. al 1996; ROSA-FREITAS 1998; PÓVOA et. al 2001).

Rotineiramente, a técnica usada para a verificação da infecção de anofelinos por plasmódios é o exame direto da glândula salivar e do estômago, seguida da observação dos esporozoítas ou oocistos, por microscopia. Esta metodologia apresenta algumas características que dificultam sua realização em larga escala, tais como:

- Baixa sensibilidade,
- A impossibilidade de definição da espécie de plasmódio envolvida na transmissão da malária,
- A necessidade de dissecar os anofelinos mortos recentemente, o que exige execução do exame em locais próximos aos da captura, que muitas vezes não apresentam infra-estrutura laboratorial adequada,
- Ser a técnica laboriosa.

A partir da existência de anticorpos monoclonais específicos obtidos por imunização de camundongos com os peptídeos sintéticos das diferentes espécies de plasmódios, tornou-se possível a realização dos testes imunoenzimáticos (ELISA) e imunorradiométricos (IRMA) para detectar a infecção em anofelinos pois, além de apresentarem alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade nos resultados, são feitos com maior rapidez e possibilitam o processamento dos espécimes conservados, para posterior processamento em locais que apresentem uma infra-estrutura laboratorial melhor elaborada.

No que diz respeito à incriminação vetorial de uma determinada espécie, o emprego de metodologias mais sensíveis e específicas para verificar a positividade dos *Plasmodium* nos anofelinos, contribui para uma análise mais acurada sobre estimativas de risco de transmissão, quando associadas aos demais parâmetros entomológicos.

Algumas espécies foram reconhecidas como potencialmente vetoras da malária a partir da década de 80 com o advento dos testes imunorradiométricos (IRMA) e imunoenzimáticos (ELISA), como *An. nuneztovari*, *An. oswaldoi*, *An. triannulatus*, *An. brasiliensis*, *An. mediopunctatus* e *An. deaneorum* (ARRUDA et. al 1986; DEANE 1988; BRANQUINHO et. al 1993; OLIVEIRA-FERREIRA et. al 1990; KLEIN et. al 1991a; KLEIN et. al 1991b).

O estudo pioneiro no Brasil empregando ELISA, para a incriminação vetorial, foi realizado por ARRUDA et. al (1986), no Estado do Pará. Entre os 9.040 anofelinos examinados, os autores encontraram o *An. darlingi* e *An. oswaldoi* infectados com *P. falciparum* e *An. albitarsis*, *An. triannulatus*, *An. nuneztovari*, *An. darlingi* e *An. oswaldoi* infectados com *P. vivax*.

Em trabalhos realizados pelo nosso grupo em alguns municípios do Acre, testamos 3.056 exemplares de anofelinos pelo ELISA, em que o *An.*

oswaldoi foi incriminado como o principal potencial vetor da doença. Esta espécie apresentou 85,4% de prevalência total e positividade de 3,4% para o *P. falciparum*, 2,3% para *P. vivax*, 1,3% para o *P. vivax* variante VK247 e 0,4% para *P. malariae*; seguida pelo *An. deaneorum* com 11,8% de prevalência e positividade de 2,9% para *P. falciparum*, 0,3% para *P. vivax* e 0,9% para *P. vivax* VK247 (BRANQUINHO et. al 1993).

Em relação à distribuição dos vetores no Estado do Amapá, CERQUEIRA 1961, encontrou as seguintes espécies anofélicas no Município de Macapá: *An. darlingi*, *An. albitarsis*, *An. aquasalis*, *An. triannulatus*, *An. brasiliensis*, *An. nuneztovari*, *An. oswaldoi*, *An. peryassui* e *An. mediopunctatus*.

SEGURA 1998 realizou estudo entomológico em três localidades periurbanas do município de Macapá, Amapá. Pelo ELISA, o autor encontrou positividade distribuída em cinco espécies: *An. marajoara* (1,61%), *An. darlingi* (0,61%), *An. brasiliensis* (2,80%), *An. mattogrossensis* (17,39%) e *An. peryassu* (0,05%).

Entre 106 anofelinos, 90 foram identificados como *An. marajoara*, dois *An. darlingi*, nove *An. brasiliensis*, três *An. mattogrossensis* e dois *An. peryassui*. Foram positivos para *P. vivax* VK247: 25 (18 *An. marajoara*, três *An. darlingi*, quatro *An. brasiliensis*). Para *P. malariae*, oito (quatro *An. marajoara*, três *An. brasiliensis* e um *An. mattogrossensis*), para *P. vivax* e cinco (três *An. marajoara*, um *An. brasiliensis* e um *An. peryassui*), infectados com *P. falciparum*. A autora concluiu que *An. (Nys) marajoara* é o principal vetor de malária *vivax* nas áreas estudadas.

PÓVOA et. al 2001 conduziram uma pesquisa em seis localidades do Município Serra do Navio, Estado do Amapá. Dentre os 3.053 anofelinos capturados, foram identificadas 15 espécies, sendo as mais prevalentes (96,4% do total): *An. albitarsis* s. l (64,4%), *An. braziliensis*, (16,7%), *An. nuneztovari* (9,5%), *An. triannulatus* (5,8%).

Os avanços metodológicos empregados na entomologia têm possibilitado uma identificação mais precisa das espécies de plasmódios que infectam os anofelinos, assim como o estabelecimento de espécies críticas (ZIMMERMAN 1992; WILKERSON et. al 1995).

Além dos testes imunológicos, algumas metodologias foram desenvolvidas para a verificação da infecção por plasmódios em anofelinos. A reação em cadeia da polimerase (PCR), executada com primers espécie-específicos ou gênero-específicos são capazes de detectar dez esporozoítas e um único oocisto no material analisado (TASSANAKAJON et. al 1993, SNOUNOU et. al 1993).

Recentemente foi padronizado o ensaio imunocromatográfico VecTest™ Malária, capaz de detectar a proteína circunsporozoíta do *P. vivax* 210, *P. vivax* VK 247 e *P. falciparum*. Em testes de laboratório, esta técnica apresentou sensibilidade de 1,0 ng/ml para a proteína CS das três espécies de plasmódios. Desde que bem padronizado, o ensaio será muito adequado em pesquisas de campo, pois uma das principais vantagens é a rapidez na sua execução, cerca de 15 minutos, além de não necessitar de equipamentos sofisticados.

Até o momento, foram realizados estudos preliminares testando o VecTest™ em 13 países na África, Ásia e Américas com diferentes situações epidemiológicas para a malária, mostrando sensibilidade e especificidade comparáveis ao ELISA (Navix-inc.com/intro.html).

Dadas as particularidades da região amazônica, que apresenta diferentes situações epidemiológicas, é de extrema importância uma adequada caracterização do comportamento dos vetores, o conhecimento dos parasitas circulantes, aspectos da população humana e do ambiente.

O desenvolvimento de metodologias capazes de verificar a infecção de plasmódios nos vetores que apresentem alta sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, facilidade na execução e baixo custo,

aliados aos estudos de biologia e comportamento e ao emprego de técnicas moleculares para a definição de espécies críticas pode contribuir para o desenvolvimento de modelos mais apropriados no entendimento da dinâmica de transmissão da doença.

1.7. As variantes do *Plasmodium vivax*

Em relação aos plasmódios, grandes avanços nas pesquisas foram alcançados por intermédio da demonstração da existência de antígeno específico de esporozoítas denominado proteína circunsporozoíta (CS), capaz de distinguir entre as várias espécies de *Plasmodium* (NUSSENZWEIG e NUSSENZWEIG 1985). Esta proteína é estágio-específica com epítomos repetitivos imunodominantes (ZAVALA et. al 1986).

O seqüenciamento da proteína CS de *Plasmodium* e a clonagem dos genes correspondentes evidenciaram uma região central com uma seqüência de aminoácidos repetitivos constituída de 373 aminoácidos, com uma região central de 19 repetições consecutivas do nonapeptídeo Asp-Arg-Ala-Asp/Ala-Gly-Gln-Pro-Ala-Gly (DRAD/AGQPAG), totalizando 49% da proteína. A seqüência não repetitiva do gene, apresenta grande homologia com os genes do *P. cynolmogi* e com *P. knowlesi*, causadores de malária simiana (ARNOT et. al 1985).

Por alguns anos, acreditou-se que a proteína CS se mantivesse conservada entre as distintas espécies de plasmódios e entre os diferentes isolados geográficos, contudo, para *P. vivax*, foram descritas duas variantes da proteína CS, denominadas de *P. vivax* VK247 e *P. vivax*-like humano (ROSENBERG et. al 1989; QARI et. al 1993).

A variante *P. vivax* VK 247 foi descrita por ROSENBERG et. al (1989) ao estudarem pacientes da Tailândia com infecção pelo *P. vivax*. Neste estudo verificou-se a presença de uma heterogeneidade fenotípica na região repetitiva da proteína CS. Ao tentar reagir esporozoítas, isolados de anofelinos alimentados com sangue de alguns desses pacientes, constatou-se que eles não foram reconhecidos por anticorpos monoclonais dirigidos contra diferentes cepas de *P. vivax* e de outras espécies de malária humana e simiana. *P. vivax* VK247 difere em 6/9 aminoácidos [ANGA(G/D)(N/D)QPG] contidos na mesma seqüência encontrada em todas as proteínas CS descritas anteriormente [GDRA(D/A)GQPA] (ARNOT et. al 1985).

QARI et. al (1993), por intermédio de metodologia similar à empregada na descrição da variante VK247, ao pesquisarem sangue de pacientes da Papua Nova Guiné, usando oligonucleotídeos específicos, encontraram um parasita morfologicamente semelhante ao *P. vivax*, porém apresentando a região repetitiva da proteína CS idêntica à encontrada no *P. simiovale* [APGANQ(E/G)GGAA], um plasmódio localizado no macaco *Rhesus* muito semelhante ao *P. ovale* humano.

Esta nova variante foi denominada *P. vivax like/ P. simiovale* e tem sido alvo de discussões sobre questões evolutivas do parasita. Informações mais precisas poderão elucidar se o *P. vivax like* é um membro da espécie *P. vivax* ou um novo parasita de malária humana (OLIVEIRA et. al 1995).

Alguns trabalhos foram realizados para verificação da distribuição global do *P. vivax* VK247 e ou *P. vivax like* como os de COCHRANE et. al (1990) com soros provenientes da Índia e do Brasil, os de KAIN et. al 1991, em população africana, os de KAIN et. al (1992), com soros do México, Papua Nova Guiné e Afeganistão, os realizados por WIRTZ et. al (1992); KAIN et. al (1991,1992) em população da Tailândia, entre outros.

No Brasil, ARRUDA et. al (1996) realizaram um importante estudo sorológico sobre a distribuição das variantes em populações residentes nos Estados do Pará, Rondônia e Mato Grosso, onde se verificou alta positividade para anticorpos antiesporozoítas do *P. vivax-like*. Dentre os soros analisados, Rondônia apresentou a maior porcentagem (85%), seguida do Mato Grosso (70%) e Pará (61%). As positivities para as variantes VK 247 também foram extremamente elevadas: 71% no Pará, 76% em Rondônia e 76% no Mato Grosso.

Ainda na bacia amazônica nos Estados do Amapá, Rondônia e Pará, um interessante trabalho foi realizado por MACHADO (1997), cujo objetivo principal foi verificar a distribuição do *P. vivax* VK210 (*P. vivax* clássico), *P. vivax* VK 247 e *P. vivax* like, por meio da amplificação do gene codificador da proteína CS, procurando-se correlacionar o tipo de *P. vivax* com os sinais e sintomas da doença. Os resultados estão apresentados abaixo, e foram concordantes com os de ARRUDA et. al (1996) nos Estados de Rondônia e Pará.

	<i>P. vivax</i> VK247	<i>P. vivax</i> /like	<i>P. vivax</i> VK 210
Amapá	71,4%	71,4%	85,7%
Rondônia	69,7%	60,6%	84,8%
Pará	60,0%	42,5%	87,5%

Em relação aos sinais e sintomas, os autores não verificaram nenhuma característica diferente da encontrada na literatura. As implicações clínicas das variantes precisam ser melhor estudadas (MACHADO e PÓVOA 2000; RODRIGUES et. al 2000).

Um inquérito soro-epidemiológico foi conduzido no Estado do Pará por ARRUDA et. al (1998), no qual se verificou a presença do *P. vivax* VK247 e *P. vivax* like em soros de populações indígenas que foram trabalhadas pela autora cerca de 12 anos atrás, mostrando que as variantes coexistem com *P. vivax* clássico, no mínimo ao longo deste período.

O estudo da distribuição do *P.vivax* VK 247 e *P.vivax* like na população humana e anofélica foi feito no Estado do Acre por KREMSNER et. al (1992); BRANQUINHO et. al (1993) e MARRELLI et. al (1998). Embora tenham sido realizadas nas mesmas localidades, as coletas não ocorreram ao mesmo tempo.

A suscetibilidade do *P.vivax* nos anofelinos foi estudada por GONZALEZ-CERON et. al (1999), que por intermédio de demonstração *in vitro* de colônias de *An albimanus* perceberam serem estas mais suscetíveis ao *P. vivax* VK210 do que ao *P. vivax* VK247; e *An. pseudopunctipennis* mais suscetíveis ao *P. vivax* VK247 do que ao *P. vivax* VK210 (clássico).

Recentemente os estudos de RODRIGUEZ et. al (2000) confirmaram estes resultados, mostrando que *An. albimanus* é o principal vetor VK210 enquanto *An. pseudopunctipennis* pode transmitir ambas as espécies. As implicações clínicas das variantes de *P. vivax* não estão inteiramente compreendidas (MACHADO e PÓVOA 2000; RODRIGUEZ et. al 2000).

A literatura atual apresenta vários trabalhos sobre as variantes do *P. vivax*, porém a maioria restringe-se a sua distribuição na população humana ou anofélica de forma independente. Existe uma carência de estudos científicos que analisem a relação entre os parâmetros de transmissão entomológica com a incidência da malária, para fornecer maiores subsídios científicos a um melhor planejamento das ações de controle.

2. Justificativa

A malária é um problema de grande magnitude e de difícil resolução. Assim, é plenamente justificável a escolha desta doença por parte da Organização Mundial da Saúde, como uma de suas grandes prioridades (WHO 2000).

A heterogeneidade das situações maláricas ocorridas no Brasil fez com que as estratégias do programa de controle da endemia adotadas pela Fundação Nacional da Saúde fossem adaptadas às realidades locais, substituindo definitivamente a política de critério único de controle por ações regionalizadas.

Assim, para que esta meta seja efetivamente atingida, é de extrema importância uma caracterização adequada do comportamento das espécies vetoras, dos parasitas circulantes, da população humana e do ambiente, nos diferentes ecossistemas brasileiros.

Estudos de malária em populações ribeirinhas no Brasil são escassos, assim como estudos sobre a fauna culicidiana da Região Amazônica e a sua potencialidade de transmissão. Desta forma, estudos desta natureza visam a um melhor entendimento da dinâmica local de transmissão.

A introdução de metodologias mais sensíveis, específicas e de fácil realização no diagnóstico humano ou nos vetores aos programas de controle favorecem o desenvolvimento de um modelo mais eficiente ao entendimento da dinâmica de transmissão da doença. Além disso, maiores informações sobre a distribuição das espécies vetoras em determinada área, aliada ao conhecimento da potencialidade de transmissão do parasita, podem igualmente contribuir para a execução e aperfeiçoamento dos programas adotados pelas autoridades responsáveis pelo controle da endemia no Brasil.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Estudar os fatores de transmissão da malária nas localidades de São Raimundo de Pirativa, Santo Antônio e São João situadas no Estado do Amapá, buscando caracterizar o nível de endemicidade da doença, obtendo dados que esclareçam pontos não conhecidos sobre a dinâmica de transmissão local e fornecendo, assim, subsídios para o planejamento mais adequado de medidas de controle da endemia nessa região.

Objetivos específicos

1. Verificar a ocorrência de infecção pesquisando-se o parasita no sangue periférico da população por meio do esfregaço sangüíneo e da técnica da gota espessa;
2. Verificar a ocorrência de anticorpos contra formas assexuadas (sangüíneas) de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, por meio de reação de Imunofluorescência Indireta (IFI);
3. Verificar a ocorrência de anticorpos em soros da população pelo método imunoenzimático (ELISA), empregando peptídeos sintéticos correspondentes à região repetitiva da proteína CS de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum*; *Plasmodium vivax* "clássico"; *Plasmodium vivax* VK247, *Plasmodium vivax*-like humano/ *P. simiovale*;

4. Estudar a distribuição das espécies de anofelinos na época de estudo;

5. Determinar o índice de infecção nos anofelinos pelo ELISA utilizando anticorpos monoclonais dirigidos contra a porção repetitiva específica da proteína circunsporozoíta (CS) do *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*; *Plasmodium vivax* "clássico", *Plasmodium vivax* VK247 e *Plasmodium vivax*-like humano/*P. simiovale*;

6. Verificar eventuais associações entre os resultados obtidos nos estudos parasitológico, sorológico e de infecção de anofelinos com a ocorrência de malária;

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Delineamento experimental e aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo-COEP em Sessão Ordinária de 18/4/2000, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96 sob o número 283 (Anexo 2).

Inicialmente os participantes foram esclarecidos no que diz respeito aos objetivos, riscos e benefícios da pesquisa, assim como sobre os procedimentos aplicados para a coleta das amostras de sangue da população local e dos dados epidemiológicos. Neste estudo a participação dos indivíduos foi condicionada a seu consentimento informado e envolveu autorização dos pais no caso de menores de idade.

Os pacientes com resultado negativo foram devidamente informados e os que apresentaram resultado positivo receberam o tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde sob prescrição da médica infectologista Dra. Júlia Maria da Silva Voorham, da Secretaria do Estado da Saúde do Amapá.

4.2. ÁREA DE ESTUDO

4.2.1. Aspectos físicos da região

"Nas terras do Amapá, as águas circulam em imensos caudais. O mar avança pelos leitos dos rios. A mistura das águas faz a beleza da terra. A festa aquática é anunciada pela pororoca. O Oceano Atlântico e o Rio Araguari se combinam em ondas que chegam a 5m de altura, com muito barulho. Maré alta e cheia do rio, na época das chuvas, provocam o fenômeno, melhor observado entre abril e junho" (in :Lista Telefônica do Amapá 1996 p. 10)

Um pouco da história do Município

Com o nome de Capitania da Costa do Cabo, a área correspondente ao atual Estado do Amapá foi doada em 1637 ao português Bento Manuel Parente, que a defendeu de duas invasões, uma inglesa e outra holandesa, ainda no mesmo século. Naquela época os limites territoriais não apresentavam contornos físicos definidos, o que só veio a acontecer em 1713 pelo Tratado de Utrecht, no qual foram estabelecidas as fronteiras entre o Brasil e a Guiana Francesa, limites estes que não foram respeitados pelos franceses (SANTOS 1998).

Os primeiros colonizadores da região foram casais de açorianos que chegaram à Costa de Macapá, como era então chamado o canal norte do Rio Amazonas, em 1751, onde se estabeleceram. Colonizadores franceses, holandeses, irlandeses e ingleses mantinham relações comerciais com os índios havia algum tempo e apresentavam uma política de expansão

territorial em toda a região, que era considerada pelos portugueses como de sua propriedade. Isso causava constantes ameaças de perda do território, exigindo de Portugal medidas práticas de segurança e de controle. Desse modo, os portugueses construíram uma rede de fortificações para garantir o domínio lusitano no extremo norte do Brasil e seus limites das incursões (SANTOS 1998).

No início do século XIX, após a formação do território, houve um intenso desenvolvimento da região causado pelas descobertas das potencialidades econômicas da área, oriundas da exploração do ouro e da extração da borracha, cujos preços estavam em ascensão no comércio internacional. Em consequência do desenvolvimento econômico, iniciaram-se as crescentes disputas territoriais, deflagrando-se a invasão francesa, em maio de 1895.

A posse da região pelo Brasil ocorreu em janeiro de 1900 pela incorporação do território ao Estado do Pará, com o nome de Araguaia e, em 1943, passou à administração do governo federal, chamando-se, então, Amapá nome originado de uma árvore, o amapazeiro que produz um leite muito usado pelo caboclo no tratamento de doenças pulmonares (AMAPAGE 2000).

Com a implementação da economia local em 1945 pela descoberta de grandes jazidas de manganês, ocorreu uma nova divisão territorial na qual toda a região situada ao norte do Rio Cassiporé formou o município do Oiapoque. Esta área foi posteriormente desmembrada, constituindo o município de Calçoene.

Após a criação do Estado do Amapá em 5 de outubro de 1988 e a área de livre comércio nos municípios de Macapá e Santana, em 1991, o Estado passou a ser um novo pólo de migração na Região Amazônica.

4.2.1.1. Localização

O Estado do Amapá está localizado na porção nordeste do Norte do Brasil, entre 4° de latitude Norte e 1° de latitude Sul e entre 50° e 54° de longitude Oeste. Apresenta uma área de 143.453,7 km², o que equivale a 3,95 % da região Norte e 1,65% do território nacional. A extensão fronteiriça do Estado é de 2.392 km, sendo 707 km equivalentes às fronteiras internacionais com a Guiana Francesa (655 km) e com o Suriname (52 km). As fronteiras nacionais estabelecem-se com o Estado do Pará (1.093 km) e com o Oceano Atlântico (598 km - IBGE 1997).

O Estado faz limite ao norte com a Guiana Francesa, a nordeste com o Suriname, a oeste com o Rio Amazonas e Estado do Pará. O pico culminante do Estado é a Serra do Tumucumaque, com 500 metros sobre o nível do mar, localizada a noroeste do Estado (Governo do Estado do Amapá 2000). O estado é constituído pelos 16 municípios abaixo relacionados:

Amapá: seus distritos são Amapá e Sucuriju, limita-se com os municípios de Macapá, Calçoene, Ferreira Gomes, Pracuúba, Tartarugalzinho, Cutias e Oceano Atlântico.

Amapari: limita-se com o Oiapoque, Laranjal do Jari, Mazagão, Porto Grande, Ferreira Gomes, Água Branca do Amapari.

Calçoene: é formado por dois distritos: Cunani e Lourenço, limita-se com o Amapá, Oiapoque, Pracuúba, Água Branca do Amapari, Ferreira Gomes e com o Oceano Atlântico.

Cutias: limita-se com Tartarugalzinho, Amapá, Macapá e Ferreira Gomes.

Ferreira Gomes: limita-se com Macapá, Calçoene, Pracuúba, Tartarugalzinho, Cutias, Água Branca do Amapari e Porto Grande.

Itaubal: limita-se com Macapá e Oceano Atlântico.

Laranjal do Jari: possui um distrito que é Laranjal do Jari, limita-se com Mazagão, Oiapoque, Guiana Francesa, Suriname e Amapari.

Macapá: está dividido em quatro distritos: Macapá, Bailique, Fazendinha e São João. Macapá limita-se com os municípios de Amapá, Santana, Ferreira Gomes, Cutias e Porto Grande.

Mazagão: possui três distritos: Mazagão, Mazagão Velho e Carvão, limita-se com Santana, Laranjal do Jari, Guiana Francesa, Amapari e o Rio Amazonas.

Oiapoque: apresenta os distritos Oiapoque, Clevelância e Vila Velha, limita-se com Calçoene, Laranjal do Jari, Guiana Francesa, Amapari, Água Branca do Amapari e Oceano Atlântico.

Porto Grande: limita-se com Macapá, Ferreira Gomes Amapari, Mazagão e Santana.

Pracuúba: limita-se com Calçoene, Amapá, Tartarugalzinho e Ferreira Gomes.

Santana: possui quatro distritos: Santana, Igarapé do Lago, Ilha de Santana e Igarapé da Fortaleza, limita-se com Macapá, Mazagão e Porto Grande.

Serra do Navio: limita-se com o Oiapoque, Calçoene Ferreira Gomes e Amapari.

Tartarugalzinho: possui o distrito de Tartarugalzinho limitando-se com Amapá, Ferreira Gomes, Pracuúba e Cutias.

Vitória do Jari: limita-se com Laranjal do Jari e Mazagão.

A capital do Estado é Macapá, um porto fluvial situado ao norte do Rio Amazonas. Ocupa uma área de 6.562,4 km², a uma altitude de 16,5 metros. É a única capital brasileira à margem esquerda do Rio Amazonas cortada pela linha do equador. O nome Macapá é uma variação de Macapa-ba, que significa "estância das macabas", um fruto gorduroso originário da macabeira, uma palmeira nativa da região.

Em 1758, no dia 04 de Fevereiro, foi fundada a Vila de São José de Macapá. Um século depois, em 06 de setembro de 1856, a Vila veio a receber foros de cidade. O termo Macapá é uma variação de Macapaba, que na linguagem indígena quer dizer "estância de Macabas" ou "lugar de abundância de Bacaba", que é uma fruta regional da qual se extrai um vinho típico. Antes do nome Macapá, o primeiro nome oficial dado às terras foi Nueva Andaluzia, em 1544, pelo então rei da Espanha, Carlos V. (in: Portal da Amazônia 03 de Fevereiro de 2001, p 24)

Escolhemos para este estudo uma área florestal inundada, situada ao longo do Rio Matapi, constituída por três localidades pertencentes ao município de Santana: São Raimundo do Pirativa, Santo Antônio e São João. O acesso até as comunidades se dá a partir de Macapá por estrada até o município de Santana e de lá de barco até a localidade de São Raimundo (cerca de 3 km), em seguida São João (cerca de 5 km) e finalmente Santo Antonio (cerca de 10 km). A população das três localidades é totalmente ribeirinha.

No que diz respeito ao padrão habitacional da população, as moradias são constituídas por palafitas de madeira, das quais 85% apresentam dois cômodos e as demais, 3 cômodos. Nestas condições vivem em média de quatro a cinco pessoas. Um dos cômodos é usado como dormitório para a

família e o outro é usado como cozinha. As casas apresentam paredes incompletas e são isoladas umas das outras.

Não há registro sobre o número exato de casas e de moradores desta região. A líder comunitária estima que habitem cerca de 400 moradores nas três localidades.

AMAPÁ

BRASIL

Região do Rio Matapí

4.2.1.2. Clima

O clima predominante é o equatorial superúmido com temperaturas máximas e mínimas aproximadas de 36°C e de 20°C. A temperatura máxima absoluta é atingida entre 17 horas e 19 horas, e a mínima ocorre ao alvorecer, entre as 5 horas e 7 horas (SUDAM 1994)

Durante o ano, duas estações são definidas: o inverno, que se caracteriza pelas fortes descargas fluviais desde fins de dezembro até agosto, e o verão, com predominância dos ventos alísios, de setembro a dezembro. A estação das chuvas dá-se entre os meses de março, abril e maio, apresentando índice pluviométrico médio mensal de 2.112,9 mm³. A época de seca estende-se de setembro a novembro, com índice pluviométrico médio mensal de 177,8 mm³. O regime pluviométrico diverge de localidade para localidade em razão da umidade relativa do ar, que é de aproximadamente 85%, e sofre influências do mar e da floresta (GEOCITIES 2000).

4.2.1.3. Geomorfologia

Do ponto de vista do relevo, o Estado é formado por três unidades morfológicas pouco acidentadas constituídas por: Planalto Cristalino na porção norte do Estado, contendo numerosas extensões de colinas e morros, denominados de cristas montanhosas, como a Serra do Tumucumaque, Serra Lombard, Serra Estrela, Serra da Agaminuara ou Uruaitu, Serra do Noucoru, Serra do Navio, Serra das Mungubas, Serra da Pancada, Serra do Iratapuru, Serra do Acapuzal, Serra Culari, Serra Aru, entre outras; Planícies Litorâneas, formadas por terrenos baixos e alagadiços e Planícies Aluviais presentes nos baixos e médios cursos dos rios (GOVERNO DO ESTADO DO AMAPÁ 2001).

4.2.1.4. Recursos Hídricos

O Estado é formado por uma malha extensa de rios totalizando 143.453,7 km², dos quais 39% pertencem à bacia amazônica e o restante à bacia do Atlântico Sul. Os rios mais longos são o Jari, o principal afluente do Amazonas; o Araguari, maior rio do interior do Estado, e o Oiapoque, que faz fronteira com a Guiana Francesa (GEOCITIES 2000).

Um fenômeno natural encontrado na região é a pororoca, que conjuga a beleza e a violência advindas do encontro das águas do mar com as do Rio Araguari. Sua ocorrência deve-se à elevação súbita das águas na foz, provocada pelo encontro das marés ou de correntes contrárias, constituindo-se em um obstáculo que as impede de seguir o percurso natural. Ao ultrapassar esse obstáculo, as águas correm rio adentro em alta velocidade, atingindo alturas de três a seis metros. O fenômeno acontece na foz do Rio Araguari, na ilha do Bailique, no Canal do Inferno da Ilha de Maracá e em várias áreas insulares, durante os meses de janeiro a maio. Os índios do baixo Amazonas chamam a pororoca de poroc-poroc, que significa destruidor.

"A pororoca prenuncia a enchente. Alguns minutos antes de chegar, há uma calmaria, um momento de silêncio. As aves se aquietam e até o vento parece parar de 'soprar'. É ela que se aproxima. Os caboclos já sabem e rapidamente procuram um lugar seguro como enseadas ou mesmo os pontos mais profundos dos rios para aportar suas embarcações seguras de qualquer dano, pois a canoa que estiver na 'baixa-mar', onde ela bate furiosa e barulhenta, levando árvores das margens, abrindo furos, arranca, vira, leva consigo."

(in:<http://www.jandleo.vila.bol.com.br/amapa/amapa.htm>).

Os rios Calçoene e Maracá também apresentam grande importância local, cheios de cachoeiras e corredeiras, possuem enorme variedade de peixes, em que se destaca, em particular, o Tucunaré muito apreciado pela população local (GEOCITIES 2000).

A energia hidrelétrica é gerada pela Eletronorte, empresa estatal federal que administra o sistema com 75% da capacidade instalada; em decorrência disso, os custos para o consumidor são extremamente elevados. O município de Macapá consome aproximadamente 72% da energia gerada e o de Santana consome 18%, sendo a classe de consumo mais importante a residencial, que utiliza a metade da energia gerada. Já as atividades comerciais consomem 17% em Macapá e 13% em Santana. Nos últimos três anos, o consumo de energia aumentou em 70% no Estado, graças ao fornecimento para várias comunidades rurais e periféricas da capital.

4.2.2. Aspectos bióticos da região estudada

4.2.2.1. Flora

A área alterada do Estado do Amapá, incluindo-se desmatamentos e outras formas de interferência humana, é de 2.795,5 km², o que corresponde a 1,9% do território nacional (GOVERNO DO ESTADO DO AMAPÁ 1998).

O Estado apresenta uma vegetação florestal extremamente diversificada, constituída por uma cobertura vegetal com o domínio de formações campestres compostas pelos cerrados e campos de várzea (inundáveis ou aluviais) e pelas formações florestadas compostas pela Floresta de Várzea, inundada apenas nas cheias dos rios, Floresta de Terra Firme, bastante densa e não atingida pelas inundações, e os Campos, que podem ser inundáveis ou limpos, predominando, porém, os campos inundáveis.

A Floresta de Terra Firme é o ecossistema mais importante do Amapá. Ocupa extensa área, de aproximadamente 70% da superfície. Apresenta o maior potencial produtivo da região e a maior biodiversidade e biomassa com espécies de grande valor econômico: madeireiro, oleaginoso, resinífero, aromatizante, corante, frutífero ou medicinal (AMAPAGE 2000).

Nas partes baixas que estão constantemente alagadas da planície litorânea, encontra-se uma vegetação composta por manguezais, formando um ecossistema bem delimitado ao longo da região costeira e diretamente influenciado pela hidrodinâmica do Rio Amazonas. Esta região apresenta alta produtividade primária com significativa riqueza e diversidade de estoques faunísticos, estuários e oceânicos.

A castanheira e o angelim, árvores que podem atingir 40 metros de altura, são na região as espécies predominantes, e de grande importância econômica. O acapu, ucuúba, cedro, pau mulato, macacaúba, maçaranduba, jatobá, pracuúba, pau rosa, pau amarelo, piquiá, aquariquara, sucupira são comumente aproveitados pela indústria madeireira. Além dos vegetais

acima, encontramos também grande quantidade de cipós, empregados na indústria de móveis artesanais, como as palmeiras, açazeiro, bacabeiras, buritizeiro, tucumanzeiro, ubuçuzeiro e outras (GOVERNO DO ESTADO DO AMAPÁ 2001).

Uma das palmeiras mais importantes é o açazeiro, cujo fruto é muito usado na alimentação. Com o caule constroem-se as habitações da população e com os caroços se faz o adubo empregado nas hortas. Nas matas, encontram-se plantas medicinais como a quina utilizada na terapêutica da malária.

A Floresta de Várzea compõe toda a área de influência fluvial e representa o ambiente típico da bacia amazônica, inclusive em termos de ocupação econômica formada pelas populações ribeirinhas. Aqui predominam espécies de alto valor produtivo e de grande importância sócio-econômica como o açazeiro, andiroba, seringueira, virola, pau-mulato, macacaúba, entre outras (AMAPAGE 2000).

O cerrado ocupa a faixa de domínio geológico de formação de barreira que representa biogeograficamente um enclave do ambiente típico do Brasil Central. Apresenta um arsenal de espécies endêmicas e uma grande intervenção antrópica em razão da presença nesses ecossistemas dos principais cultivos florestais homogêneos.

O Campo de Várzea é um ambiente largamente distribuído no Estado, de natureza aluvial e submetido a regimes flúvio-pluviais ligados a um complexo sistema de drenagem que envolve cursos d'água, lagos temporários e permanentes.

A figura 3 apresenta em fotografia características ecológicas da região estudada.

Figura 3- Paisagem típica da localidade de São Raimundo de Pirativa, Amapá, março, 2000.

Fotógrafa: Sabrina dos Santos Ruiz

4.2.2.2. Fauna

O Estado do Amapá apresenta grande diversidade faunística nativa, com algumas das espécies ameaçadas de extinção. Dentre as inúmeras espécies presentes destacam-se a onça pintada, araras, paca, macaco guariba, boto rosa, gavião real, papagaio, preguiça e peixe-boi, entre outras.

A onça pintada (*Panthera onça*), conhecida também por cangaçu, onça-cangaçu, jagaretê, jaguar, jaguar-cangaçu, é encontrada com frequência na região de São Raimundo de Pirativa. A cor é bastante variável, predominando o laranja e o preto, sendo a coloração das fêmeas mais clara que a do macho. Uma variação melânica da onça-pintada é a onça-preta, cuja pelagem amarela é substituída por uma outra mais escura, mantendo as rosetas. A onça se alimenta de peixes, veados, macacos, antas, tartarugas, jacarés, preguiças e pássaros (AMAPAGE 2000).

A espécie é hábil pescadora e nadadora, movendo-se de acordo com a presença das diversas espécies de presas que compõem sua dieta, especialmente nesta região, onde as inundações contribuem para a dispersão e deslocamento dos animais. Apesar do corpo compacto, ela se movimenta com graça e agilidade. Aproxima-se silenciosamente de sua vítima, atacando-a de improviso, geralmente fraturando--lhe o pescoço. Depois arrasta a presa para o meio da vegetação, fazendo reserva de alimentos. Sua força é excepcional. O olfato não é aguçado, mas a visão é penetrante e acurada (AMAPAGE 2000)

A pele da onça é muito procurada pelos moradores da região, que caçam o animal para exportá-la ao Suriname ou à Guiana Francesa. Esta prática é o principal fator de diminuição da presença desta espécie na floresta. Os altos preços da pele no comércio exterior funcionam como incentivo à contravenção. A bacia amazônica é uma das últimas regiões brasileiras em que ainda são encontradas, porém o futuro da espécie pode ser comprometido em virtude da acelerada destruição de seu habitat. Nas localidades estudadas por nós, onde ocorre predomínio da pecuária de

búfalos, as onças são caçadas pelos moradores por representarem risco permanente para o rebanho.

Outra espécie encontrada na região é o boto cor-de-rosa (*Iniba geoffrensis*), conhecido também como boto ou boto-vermelho. Alimenta-se de peixes, moluscos e crustáceos. A espécie é muito citada em lendas narradas pela população.

A anta (*Tapirus terrestris*) é um mamífero muito encontrado e apreciado como alimento na região. Chamada também de tapir, é um dos maiores animais terrestres presentes no Amapá. Mede até 2 metros de comprimento e 1 metro de altura, chegando a pesar 200 Kg. Mergulha e nada com facilidade, refugiando-se nas matas que beiram as águas dos rios, alimentando-se de frutas (AMAPAGE 2000).

Em relação às aves, estas ocupam um lugar de destaque no Estado do Amapá e vêm sendo estudadas no Programa de Prioridades de Conservação para a avifauna da Amazônia, no subprograma Aves do Amapá, 2001. Este programa contém um banco de dados com uma listagem de cerca de 400 espécies de aves do Estado.

O estudo das aves vem sendo realizado em diferentes ecossistemas do Amapá, entre eles, o ambiente do cerrado, incluindo-se áreas entre os eixos Macapá - Porto Grande - Amapá, em formações de cerradão, campo limpo, campo sujo e matas ciliares. Vem sendo feito também na Serra do Navio, nas localidades compreendidas entre Porto Grande (onde se inicia o domínio da floresta amazônica), Serra do Navio e Serra Grande e em ambientes próximos ao litoral, abrangendo áreas de campos alagados e manguezais nas regiões de Aporema, Pracuúba, nos arredores de Macapá e Santana (Vila Amazonas, Fazendinha, Lago dos Índios e Igarapé do Curiau) (PROGRAMA AVIFAUNA 2001).

Nas últimas áreas citadas, situam-se as localidades estudadas por nós próximas ao Rio Amazonas. Possuem florestas ribeirinhas que fazem

parte de uma região de transição, apresentando tanto aspecto florestal como de cerrado, de mata ciliar e de alagados.

De barco, pelos largos rios rodeados pelo verde da floresta, podemos apreciar o maravilhoso canto dos pássaros ou, com um pouco de sorte, observar duas das mais lindas aves encontradas na região: o guará (*Eudocimus ruber*) e a arara piranga (*Ara macao*) em seus ninhos.

4.2.3. Características socio-econômicas

4.2.3.1. Infra-estrutura básica

Esta região apresenta inúmeros problemas nos serviços de infraestrutura básica, saneamento, serviços de saúde, educação, abastecimento e transporte público.

O abastecimento é deficiente. Somente São Raimundo de Pirativa possui um pequeno estabelecimento comercial para venda de bebidas e poucos alimentos. Os moradores dirigem-se até Santana para compra de mercadorias. Não há infraestrutura de saneamento básico nas localidades de São Raimundo de Pirativa, Santo Antônio e São João. A água usada para o abastecimento doméstico e para as atividades de trabalho é retirada diretamente do rio e estocada em galões, bacias ou baldes de alumínio ou plástico, sendo assim utilizada pela população, sem tratamento prévio. Não existe tratamento de esgoto ou alguma forma mais sistematizada de coleta de lixo, o que expõe constantemente os moradores a diversas doenças, já que os rios recebem diretamente os dejetos provenientes da ocupação humana e dos chiqueiros, galinheiros e currais.

A presença de ratos é bastante comum no interior e nas circunvizinhanças das palafitas. Podemos observá-los a qualquer hora do dia na cozinha, armários, pias, fogões, guarda-roupas, dentro de sofás e caminhando pela casa. Os roedores domésticos são vistos de maneira natural pela população, que desconhece os malefícios que podem causar à saúde.

A figura 4 apresenta um exemplo da deficiência na infraestrutura básica de saneamento encontrada nas três comunidades estudadas.

Figura 4: Aspectos da infra-estrutura básica de saneamento presente na região do rio Matapí, Amapá, março, 2000.

Fotógrafo: José Maria Soares Barata

4.2.3.2. Saúde

O Estado do Amapá apresenta inúmeras dificuldades no atendimento à saúde da população, igualmente às demais regiões da Amazônia brasileira. Neste contexto, foi criado o Caixa Saúde, parte integrante do Programa de Desenvolvimento Sustentável do Amapá, visando a gestão descentralizada das ações de governo.

O Caixa-Saúde é uma experiência de descentralização da gestão governamental, na qual os recursos são repassados diretamente às unidades de saúde e administrados por uma associação formada por representantes da comunidade e servidores das unidades de saúde, na tentativa de tornar o atendimento mais ágil e eficiente (CAPIBARIBE 2001).

As parcerias de gerenciamento e responsabilidades propostas pela implementação do Caixa Saúde visam a facilitar e garantir a prestação de serviços e ações de saúde com melhor qualidade, além de serem mais próximas às realidades do usuário, uma vez que este participa com os gestores do sistema nos melhores caminhos para o melhor atendimento da população. O Caixa Saúde é uma sociedade civil, com responsabilidade jurídica de Direito Privado, sem fins lucrativos e não integra a Administração Pública. Administra recursos transferidos pela Secretaria de Estado da Saúde e outros provimentos do Município, da Comunidade, de Entidades Públicas ou Privadas e da promoção de campanhas feitas pela Unidade de Saúde (GOVERNO DO AMAPÁ 2001).

Segundo dados do Ministério da Saúde, o Amapá apresentou, em 1996, para 10 mil habitantes, 6,25 médicos, 3,97 odontólogos, 3,41 enfermeiros e dois leitos para cada 1 mil habitantes (IBGE 1997).

Nas localidades que estudamos não existem postos de atendimento médico e odontológicos para os moradores. Em razão das dificuldades do transporte, realizado unicamente de barco até Santana, se algum morador das comunidades ribeirinhas precisar de atendimento médico de emergência, correrá o risco de não chegar a tempo de receber socorro.

emergência, correrá o risco de não chegar a tempo de receber socorro. Normalmente, o professor da região é solicitado pela população a levar com o barco da escola os moradores até o posto de atendimento mais próximo.

Outra questão enfrentada na região é a ação da FUNASA no atendimento aos casos de malária, cujas ações de controle são regionalizadas por município. Assim, as localidades de São Raimundo de Pirativa e de Santo Antônio pertencem ao município de Santana e a comunidade de São João, ao município de Mazagão. Embora muito próximas umas das outras, inúmeras vezes os moradores de uma das três comunidades não são atendidos pelos funcionários da FUNASA, durante a busca ativa, por residirem em municípios diferentes da área de ação da equipe, mesmo em casos de pacientes com sintomatologia de malária (depoimento obtido da Dona Maria, moradora de São Raimundo de Pirativa, líder comunitária da região).

4.2.3.3. Educação

Segundo informações do Governo do Estado do Amapá, a educação é a principal prioridade do Estado, mais especificamente a educação fundamental (de 1ª série até a 8ª série), ensino médio (1 ano ao 3º ano) e cursos profissionalizantes em particular, nas áreas carentes. O ensino tem, como meta, a formação integral do aluno preservando e difundindo as culturas e línguas das diversas etnias (GOVERNO DO ESTADO DO AMAPÁ 2000).

O Estado mantém recursos para o ensino especial orientado para as instituições filantrópicas e comunitárias, cujo objetivo é dar assistência a formação de pessoal especializado em ensino profissionalizante. Nas áreas rurais e costeiras, priorizam-se as técnicas de agricultura, pesca, exploração florestal e mineral.

A meta do Governo é a interiorização do ensino público, que vem sendo alcançada graças à fixação do professor nas comunidades mais afastadas, pelo fornecimento de moradia. A educação ambiental também é priorizada nesta região, sendo desenvolvida com parcerias entre o Governo Estadual e a UNICEF. Os projetos de ensino são adaptados à realidade das populações, desde a arquitetura de suas casas constituídas de madeira e palha até o plano pedagógico que prioriza o ensino de técnicas em manejo da fauna, flora e o ecoturismo. (CAPIBERIBE 2001).

Dados do IBGE de 1999 para o Estado mostram:

Criança de 7 a 14 anos fora da escola: 10,3%,

Matrículas no ensino infantil: 8.974

Matrículas no ensino fundamental: 126.679

Matrículas no ensino médio: 28.599

Matrículas no ensino superior: 2.713

Analfabetismo: 12,98%.

As três localidades de nosso estudo possuem escolas de primeira a quarta séries, situadas ao longo do rio Matapi. Para dar continuidade aos estudos, as crianças devem ir ao município mais perto, Santana, o que favorece a desistência, visto que há carência de transporte na região. Alguns precisam remar mais de uma hora em pequenas canoas para chegar às salas de aula.

Os professores moram nas próprias comunidades onde lecionam. O professor responsável pela escola em São João possui um barco que carrega as crianças de suas residências até a escola diariamente.

A figura 5 apresenta a fotografia do barco que transporta as crianças diariamente até a escola local.

Figura 5: Meio de transporte utilizado pela Secretaria da Educação do Estado do Amapá na região do rio Matapi- Amapá, março 2000.

Fotógrafa: Sabrina dos Santos Ruiz

4.2.3.4. Economia

A diversidade de ecossistemas caracterizada pela biogeografia da região somada à presença de recursos naturais propiciou uma taxa média anual de crescimento econômico de 4,4% entre 1990 e 1996. O crescimento foi superior à média nacional de 3,1% e inferior ao crescimento populacional estadual de 5,3% (SUDAM 1998).

O Amapá apresenta vantagens que podem ser bem aproveitadas no mercado econômico internacional, dado o fato de ser entrada para países da Europa e fazer fronteira com países do Caribe apresentando um maior potencial de desenvolvimento quando comparado com outros estados da Região Amazônica.

A economia local depende diretamente dos recursos naturais, sendo assim exportadora de matérias-primas, de produtos primários e produtos semi-elaborados. O pino representa cerca de 50% da exportação total, seguido pelo palmito de açaí e o pescado.

A pesca é uma importante atividade extrativista no Estado. Com 698 km de costa banhada pelo Oceano Atlântico e área aproximada de 1200 km² de rede hidrográfica, o ambiente aquático apresenta grande importância para a população. Várias espécies de peixes e crustáceos de origem marinha e de água doce são capturadas pelos moradores da parte litorânea, na região da costa do Canal Norte do Rio Amazonas, que, pela combinação dos efeitos de correntes e marés, estende-se em sentido norte, ao longo do litoral, o que explica a presença da espécie da fauna de água doce nos ambientes costeiros do todo o litoral do Estado. As principais áreas produtoras de pescados são a costa oceânica, a desembocadura dos rios, a zona estuária e a planície flúvio-marinha, destacando-se a região dos lagos, interligada à reserva biológica do lago Piratuba (GOVERNO DO AMAPÁ 2001).

Várias tentativas estão sendo desenvolvidas pelo Governo para desenvolver o setor pesqueiro, objetivando industrializar a produção e criando novos produtos como a polpa do pescado e subprodutos derivados com base nas partes descartadas na filetagem de peixes como gelatina, couro, farinha, pílulas de cartilagem de tubarão e ração.

Até o momento, a exploração dos recursos pesqueiros é artesanal. Somente a captura do camarão rosa (*Pennaeus subtilis*) é feita industrialmente, sendo a produção encaminhada aos centros urbanos para comercialização. As espécies mais capturadas são o dourado (*Brachyplatystoma flavicans*), o filhote (*Brachyplatystoma sp*), a gurijuba (*Arius parken*), a pescada amarela (*Cynoscion aloupa*), a pescada branca (*Plagioscion surinamensis*), e o caranguejo (*Ucides cordatus*) (AMAPAGE 2000).

O setor primário é extremamente reduzido no Estado, apresentando um baixo nível tecnológico. O extrativismo vegetal da castanha, borracha, açaí e cacau encontra-se em pequena expansão.

O setor secundário também possui capacidade de expansão limitada em razão das deficiências de infra-estrutura causadas, sobretudo, pelo fornecimento de energia. Este setor é mantido pelo extrativismo mineral (exploração das jazidas de manganês, ouro, caulim e granito), pela construção civil e pela indústria de transformação, predominando a informalidade e o baixo nível tecnológico.

A principal riqueza mineral do Estado foi o manganês, com sua exploração iniciada em 1957. A mineração causou a formação das mais importantes reservas brasileiras e respondeu pela extração de mais de 80% da produção do País nesta atividade na década de 60. O governo cedeu a jazida por licitação pública. O grupo vencedor obteve parceiros nos Estados Unidos para iniciar os trabalhos de prospecção, que duraram cerca de dois anos. A atividade contou com altos investimentos por parte do governo

americano que, em razão de sua participação na Segunda Guerra Mundial, necessitava do metal para produzir armamentos (AMAPAGE 2001).

As jazidas foram arrendadas pelo período de 50 anos pela ICOMI, Indústria e Comércio de Mineração, do grupo Bethlehem Steel, pagando ao Governo royalties de 4% a 5% do valor do minério extraído. A renda dos royalties do manganês destinou-se à construção de uma usina, para assegurar base energética às futuras indústrias ali instaladas. Uma estrada de ferro foi construída com capacidade para 700 mil toneladas de manganês e 200 mil toneladas para outras mercadorias, e um porto, ao qual se viabilizou o acesso de navios com capacidade de 450 mil toneladas (AMAPAGE 2001).

Além do manganês, o ouro também é explorado nos garimpos dos rios Calçoene, Cassiporé, Gaivota e Igarapé de Leona, e os diamantes são encontrados na região de Santa Maria. A 80 km de Macapá, encontra-se uma jazida de 9,6 milhões de toneladas de hematita, com 70% de ferro, explorada pela empresa privada *Hanna Company* (AMAPABUSCA 2001).

Em relação ao setor terciário, que compreende a administração pública, encontramos o setor econômico mais representativo do Estado, cuja atividade de comércio e serviços superou a administração pública na geração de empregos nos últimos anos. Em 1995, entre os 102.445 indivíduos acima de onze anos de idade que desenvolviam alguma ocupação, 20% trabalhavam na administração pública, 21% na prestação de serviços e 19% no comércio em geral (AMAPAGE 2001).

Houve ativação da economia local pelo estabelecimento da área livre de comércio de Macapá e Santana, com vantagens fiscais exclusivas para consumo e venda interna dos produtos nos setores de comércio, indústria de transformação, agropecuária, piscicultura, turismo e serviços.

A atividade econômica da localidade de nosso estudo restringe-se à extração agrícola para a subsistência, pesca e criação de gado babuíno e bovino.

4.2.3.5. População e Migração

O processo de urbanização no Estado do Amapá é acentuado, visto que 80,89% dos indivíduos vivem em áreas urbanas e 19,11% na zona rural. Entre 1991 e 1996, o Estado apresentou crescimento populacional de 5,3% ao ano, passando de 289 mil para 430 mil pessoas. De acordo com o IBGE (1997), aproximadamente 50% deste crescimento decorre da migração proveniente do Pará, Maranhão e Ceará. A densidade populacional média é 2,3 habitantes por km², uma das menores do Brasil. A maior concentração populacional encontra-se em Macapá e em Santana.

Os municípios mais populosos são Macapá (256.033 pessoas), Santana (81.949), Laranjal do Jari (27.671), Mazagão (12.989, Oiapoque (11.449), Porto Grande (8.384), Vitória do Jari (7.589), Amapá (6.298), Calçoene (6.014), Tartarugalzinho (4.543) (IBGE 2000).

Figura 6: Moradia típica encontrada nas localidades de São Raimundo, Santo Antonio e São João, Amapá, março 2000.

Fotógrafo: José Maria Soares Barata

A formação étnica no Estado é diversificada (Figura 7), constituída por comunidades afro-americanas e indígenas. O Estado tem reservas indígenas protegidas que abrangem 40 mil km², cerca de 30% de sua superfície total, o que equivale ao dobro da média da Região Norte do Brasil e quatro vezes mais que a média nacional.

As sociedades indígenas pertencem a seis etnias distribuídas nos municípios de Oiapoque, Amapari e Laranjal do Jari, totalizando 5.200 indivíduos. O Amapá foi o primeiro estado brasileiro a demarcar totalmente as áreas indígenas, formadas por duas reservas totalizando 140.276 km² (8,6% do território estadual). Lá vivem as etnias Galibi, Karipuna, Karipuna, Palikur, Waiapi e Galibi Marworno (AMABUSCA 2001).

A luta das sociedades indígenas pela sobrevivência e garantia da preservação cultural e pela posse da terra recebe apoio de ONGs e dos governos alemão e francês. A viúva do ex-presidente francês François Mitterrand, Danielle Mitterrand, presidente da Fundação France Libertés, visitou o Amapá em abril de 1996, oferecendo apoio político às comunidades indígenas (MARTINS et. al 2000).

Os índios produzem artesanato para vender aos turistas, o que contribui como fonte de renda. Este artesanato apresenta padrões estéticos próprios, para cada sociedade, traduzidos nos objetos utilitários como os vasos, cestas, redes, armas e adornos produzidos com madeira, fibras, cerâmica, sementes, plumagem, dentes e ossos de animais, enfeitados com penas de aves ou pintados com corantes naturais extraídos de sementes de urucum ou casca de árvore.

A etnia africana está presente fortemente no Amapá desde o século XVIII, quando os primeiros escravos africanos foram trazidos. Atualmente a comunidade negra forma núcleos organizados, destacando-se a região do Curiaú, próxima de Macapá, formada por cinco comunidades (Curiaú de Dentro, Curiaú de Fora, Casa Grande, Curralinho e Mucambo) que totalizam cerca de 1.500 pessoas (AMAPABUSCA 2001).

As comunidades conservam suas tradições culturais por meio de festas, danças, culinária e crenças religiosas. Em 1998, foram reconhecidas pela União como remanescentes de quilombo, o que lhes assegura direitos constitucionais sobre o território que ocupam. Nas três localidades onde trabalhamos a maioria da população é de origem africana.

Figura 7: Moradores da região do Rio Matapí, Estado do Amapá, março 2000.

Fotógrafo: José Maria Soares Barata

4.2.3.6. Participações das Organizações não-Governamentais (ONGs) e Associações.

O Estado do Amapá desenvolve vários trabalhos em parceria com Organizações não-Governamentais e Associações, sendo uma das principais metas do Governo nos últimos anos (CAPIBERIBE 2001).

Atualmente diversas entidades alemãs, francesas e holandesas desenvolvem juntamente com o Governo Estadual projetos de preservação e educação ambiental, além de projetos voltados para o desenvolvimento social e econômico atendendo a grupos organizados e não organizados, algumas delas bastante atuantes. Dentre os projetos mais relevantes do Amapá, destacam-se:

Projeto de Resgate da Memória e da Cultura Oral Indígena, Apalai. Governo do Estado em parceria com o Fundo das Nações Unidas para a Infância - UNICEF.

Projeto para Aquisição de Bolsa-parteira, para atender solicitação do Projeto Resgate e Valorização das Parteiras Tradicionais do Amapá.

Projeto de Socialização da Escola Bosque - Módulo Bailique, em convênio com o Centro Amapaense de Atividades Culturais, Econômicas e Sociais - CAACES.

Projeto Escola Família Agrícola do Pacuí - Convênio com a Associação das Famílias da Escola Agrícola da Região do Pacuí.

União dos Negros do Amapá.

Projeto Programa de Apoio às Escolas de Palikur - Convênio com a Associação dos Povos Indígenas do Oiapoque - APIO.

Projeto Apoio ao Pescador Artesanal - convênio com a Federação dos Pescadores do Amapá - FEPAP.

Projeto Tyhahsamo - Convênio com a Associação dos Povos Indígenas do Tumucumaque - APITU

Recuperação e Despoluição de Áreas de Terra Waiãpi degradadas do Garimpo - Convênio com o Centro de Trabalho Indigenista.

Subprojeto Lontra - Convênio com a Associação dos Agricultores da Comunidade do Lontra, do Distrito da Pedreira.

Beneficiamento da Produção Agroflorestal da Cooperativa Mista dos Produtores e Extrativistas do Rio Iratapuru - Convênio com a Cooperativa Mista dos Produtores e Extrativistas do Rio Itapuns - COMARU.

Recuperação de Áreas Desmatadas de Florestas Nativas na Comunidade do km 142 - Efa com SAF - Convênio com o Sindicato dos Trabalhadores Rurais de Macapá - SINTRA.

Projeto de Desenvolvimento auto-sustentável da Cooperativa Mista Extrativista de Laranjal do Jari - Convênio com a Cooperativa Mista Extrativista Vegetal dos Agricultores do Laranjal do Jari.

Associação da Escola das Famílias Agrícolas da Perimetral Norte BR 210, km 167, Cachorrinho Pedra Branca do Amapari.

Associação das Escolas-Família da Região do Pacuí Rodovia Macapá-Cutias, km 123 Distrito de S. J. Pacuí Macapá.

Associação dos Povos Indígenas do Oiapoque.

Associação dos Povos Indígenas do Tumucumaque - APITU

Associação dos Trab. Agro-extrativistas da Reserva do Rio Cajari.

Centro de Trabalho Indigenista/Programa Aaiãpi.

Conselho Comunitário do Bailique

Conselho das Aldeias Waiãpi – APIN

Cooperativa Mista dos Prod. Extrativistas do R.Iratapuru COMARU

Escola Família Agrícola do Carvão

Distrito do Carvão – Queimada – Mazagão, AP

Federação dos Pescadores do Amapá – FEPAP

Instituto da Rede Brasileira Agroflorestal – REBRAF

Instituto de Estudos Sócios-Ambientais – IESA

4.3. ESTUDO DA POPULAÇÃO HUMANA

4.3.1. Coleta das informações epidemiológicas e do sangue venoso

Foi aplicado um inquérito epidemiológico domiciliar contendo informações sócio-econômicas e culturais que permitissem levantar os fatores de risco qualitativos na tentativa de caracterizar a malária local.

A coleta das informações epidemiológicas foi obtida diretamente dos participantes e, em caso de crianças menores, pelos pais ou responsáveis. As informações levantadas foram: idade, sexo, ocupação, grau de conhecimento da doença, sintomatologia, procedência, presença de malária anterior, utilização de medidas preventivas, espécie de plasmódio atual, assistência de serviços de saúde, atividades de lazer, atividades na mata, tempo de permanência na localidade e relato de deslocamentos.

O anexo 2 apresenta a ficha de investigação utilizada no inquérito epidemiológico.

4.3.2. Testes Parasitológicos

4.3.2.1. Descrição do teste da gota espessa e do esfregaço sanguíneo

A gota espessa, teste parasitológico de referência no diagnóstico da malária, foi preparada empregando-se metodologia preconizada pela OMS (BRUCE- CHWAAT 1985). O teste constitui-se na deposição de uma gota de sangue do paciente em lâmina de microscopia que, depois de sua secagem, é imersa em solução de azul de metileno fosfatado, a fim de promover a desglobinização e pré-coloração do material. Em seguida acrescenta-se à lâmina o corante de Giemsa, que após sete minutos é removido com água destilada. Após secagem do material a lâmina é examinada ao microscópio óptico com objetiva de imersão (100x) e ocular (12,5x) para a determinação da parasitemia.

Para *P.falciparum* a parasitemia foi quantificada pelo número de parasitas em relação ao número de leucócitos. Para cada gota de sangue contou-se 100 leucócitos, multiplicando-se o número resultante por 60 (considerando-se a média de leucócitos 6 mil/mm³.) O valor obtido corresponde a aproximadamente a quantidade de parasitas/ mm³ (GREENWOOD e ARMSTRONG 1991).

Para *P.vivax* a parasitemia foi expressa em cruzes:

++++ = mais de 200 parasitas por campo

+++ = de 21 a 200 parasitas

+++= de 2 a 20 parasitas

++= 1 parasita por campo

+/2= de 40 a 60 parasitas/100 campos

O esfregaço sangüíneo foi realizado com 1 a 2 μ l de sangue estendido em lâmina de vidro. Depois da secagem o sangue foi fixado em álcool metílico e corado por 20 minutos em Giemsa a 5%, previamente preparado em água tamponada destilada, pH 7,2. Após a coloração, a lâmina foi lavada, secada e examinada ao microscópio óptico comum com objetiva de imersão (100x) (WHO 1999).

4.3.3. Testes Imunológicos com os Soros humanos

4.3.3.1. Padronização e Descrição da Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

O teste foi executado protocolo de FERREIRA e SANCHEZ (1988), empregando-se antígeno de formas assexuadas de *P. vivax* e *P. falciparum* pesquisando-se anticorpos das classes IgG e IgM. Não foram realizados testes com o antígeno de *P. malariae* pois não conseguimos as lâminas contendo o parasita, inicialmente obteríamos o material do Instituto Evandro Chagas em Belém a partir de macacos infectado experimentalmente, porém estes não apresentaram parasitemias satisfatória, impedindo assim, o processamento das amostras.

As lâminas com o antígeno foram preparadas no Laboratório de Malária da Superintendência de Controle de Endemias- SUCEN, São Paulo, com sangue de pacientes primo- infectados contendo prioritariamente as formas evolutivas de esquizontes e trofozoítas maduros do *Plasmodium*.

A suspensão de hemácias infectadas foi lavada em solução de PBS pH 7,2 e, em seguida, 10 µl da solução foram adicionados em cada área demarcada da lâmina de vidro, usada no teste de fluorescência. Após secagem em temperatura ambiente e embrulhadas, as lâminas foram acondicionadas a -70°C. até serem processadas.

A determinação do limiar de reatividade da reação de IFI para a detecção de anticorpos anti formas assexuadas de *P.falciparum* e *P.vivax* das classes IgM e IgG foi feita utilizando-se 30 soros negativos de área endêmica de malária. Os conjugados foram imunoglobulinas anti- IgM e anti IgG humanas (cadeias μ e γ específicas) ligadas ao isotiocianato de fluoresceína. Inicialmente foi feita uma titulação em bloco empregando-se diluições crescentes do conjugado contra diluições crescentes dos soros, para verificação da diluição ideal do conjugado fluoresceína.

Foram testados soros controles positivos e negativos em três diluições de conjugado, 1:500, 1:1000 e 1:2000 para se obter resultados que melhor discriminassem a positividade. O limiar de reatividade foi expresso pela recíproca da diluição, 20 para IgM e 40 para IgG, com os conjugados diluídos à 1/1000, uma vez que os soros negativos apresentaram valores sempre abaixo desse título.

Tabela 6. Padronização do teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) com formas assexuadas de *P.vivax* e *P.falciparum* para detecção de anticorpos da classe IgG. Conjugado anti-IgG humano. Resultados expressos em cruces, relativas à intensidade da fluorescência (Positivos a partir de 1+).

Anti-IgG	1:500		1:1000		1:2000	
Soros	1:20	1:40	1:20	1:40	1:20	1:40
<i>P. vivax</i> *	3+	3+	2+	2+	1/2+	1/2+
<i>P.falciparum</i> ♦	3+	3+	3+	2+	1+	1+
Negativo ^	½+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

*Soro positivo Pv (IgG): Soro de área endêmica
♦Soro positivo Pf (IgG): Soro de área endêmica.
^ Soro negativo de área endêmica
Limiar de reatividade: 1:40(com 30 soros negativos testados com conjugado 1:1000.

Tabela 7. Padronização do teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) com formas assexuadas de *P.vivax* e *P.falciparum* para detecção de anticorpos da classe IgM. Conjugado anti-IgM humano. Resultados expressos em cruces, relativas à intensidade da fluorescência (Positivos a partir de 1+).

Anti-IgM	1:500		1:1000		1:2000	
Soros	1:20	1:40	1:20	1:40	1:20	1:40
<i>P. vivax</i> *	3+	3+	2+	1+	1/2+	1/2+
<i>P.falciparum</i> ♦	3+	3+	3+	2+	1+	1+
Negativo ^	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

*Soro positivo Pv (IgM): Soro de área endêmica
♦Soro positivo Pf (IgM): Soro de área endêmica.
^ Soro negativo de área endêmica
Limiar de reatividade: 1:20(com 30 soros negativos testados com conjugado 1:1000.

Descrição da técnica

Inicialmente foram acrescentos às lâminas contendo o antígeno, 10µl de cada soro que foi previamente diluído em PBS- Tween 80 a 1%, a razão 2, a partir de 1/20 e 1/40 respectivamente para a pesquisa de anticorpos antiformas sangüíneas da classe IgM e IgG. As lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37° C em câmara úmida, lavadas duas vezes em PBS (10 minutos cada) e secas. Posteriormente, o conjugado marcado com fluoresceína previamente titulado e diluído em solução de azul de Evans, foi acrescentado às lâminas, incubando as mesmas em câmara úmida por 30 minutos a 37° C. Para a remoção do excesso de conjugado as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS, secas e montadas com glicerina pH 9,5.

4.3.3.2. Padronização e descrição do ELISA com os soros humanos

O ELISA foi executado baseado na metodologia de ZAVALA et. al (1986), modificada por CURADO et. al (1997) e DUARTE (1998) para a detecção de anticorpos da classe IgG, com peptídeos sintéticos correspondentes à porção repetitiva específica para a proteína circunsporozoíta (CS) de:

P. brasilianum/*P. malariae* : MAP-29 (multiple antigen peptide): [(NAAG₄)₄ (LAL et. al 1988).

P. vivax clássico: Polímero de 45 aminoácidos (DDAAD)₉ contendo 5 aminoácidos repetitivos (NARDIN et. al 1982).

P. vivax VK247:- Peptídeo com 36 aminoácidos (ANGAGNQPG)₄ contendo 9 aminoácidos repetitivos (ROSENBERG et. al 1989).

P. vivax-like humano/*P. simiovale* PL-35, com 33 aminoácidos contendo 11 aminoácidos repetitivos (APGANQEGGAA)₃ (QARI et. al 1993).

P. falciparum: (NANPNVDP)₃ (NANP)₉ (NARDIN et. al 1982).

Estes peptídeos inicialmente seriam produzidos pelo Dr. Antônio de Miranda do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina, entretanto após inúmeras tentativas de síntese, não se conseguiu resultados satisfatórios, desta forma para *P. vivax* e *P. falciparum* utilizamos peptídeos fornecidos pela Dra. Ruth Nussensweig, da Universidade de Nova York e para as demais espécies os peptídeos foram doados pelo Dr. Almério de Castro Gomes do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Para padronização do ELISA foram feitas titulações em bloco para definição das concentrações ótimas de cada um dos peptídeos sintéticos, frente à diferentes diluições de soros positivos e negativos.

Em uma triagem inicial foram selecionados 30 soros provenientes do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sem história epidemiológica ou clínica de malária. Uma vez definidas as concentrações ideais dos peptídeos, as diluições dos soros e do conjugado, 30 amostras de soros negativos provenientes das coletas realizadas no Amapá foram processadas escolhidas aleatoriamente, para o estabelecimento do limiar de reatividade do método.

$$C.O. = X + 3 SD$$

onde: X é a média aritmética das absorbâncias dos soros padrão negativo e SD é o desvio- padrão obtido.

A padronização do ELISA foi feita para cada um dos peptídeos sintéticos separadamente, para isto, foram selecionados soros positivos e negativos por de critérios clínicos, sorológicos e epidemiológicos.

Inicialmente foram executadas titulações em bloco para definição das concentrações ótimas de cada peptídeo sintético, frente às diferentes diluições de soros positivos e negativos. Nesta titulação, ficou estabelecido

que as concentrações ideais para todos os peptídeos era de 10 µl/ml, nas diluições dos soros a 1:50 e diluição do conjugado anti IgG humano - peroxidase à concentração de 1:250. Nas concentrações acima observou-se absorbâncias máximas com os soros com IFI positiva e mínima com os soros negativos, seja de Banco de Sangue de São Paulo ou do Amapá.

Foram realizados alguns testes para a escolha do tipo de placa de microtitulação que oferecesse melhores resultados e fossem de fácil obtenção. Foram ensaiadas placas NUNC (Maxisorp e Polisorp) onde optou-se pelas de poliestireno tipo Maxisorp, visto que, não foram observadas dificuldades na aderência dos peptídeos ou "efeito borda", assim como, nenhum outro problema de ordem técnica.

Para a determinação do limiar de reatividade das reações foram executadas triagens iniciais, onde selecionaram-se 30 soros provenientes do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sem história epidemiológica ou clínica de malária.

Após serem definidas as concentrações ideais dos peptídeos, as diluições dos soros e do conjugado, foram processadas 30 amostras de soros negativos provenientes das coletas realizadas no Amapá, escolhidos aleatoriamente, estabelecendo-se assim, um limiar de reatividade mais fidedigno.

Nas tabelas 8 e 9 foram demonstrados os valores do limiar de reatividade para *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.vivax* VK247 e *P.vivax* like, pelo emprego de 30 amostras de soros provenientes do Banco de Sangue de São Paulo e 30 soros de área endêmica de malária.

Tabela 8: Valores do limiar de reatividade para cinco peptídeos sintéticos, pelo emprego de 30 amostras de soros provenientes do Banco de Sangue de São Paulo.

Tabela 8					
Peptídeos	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P.malariae</i>	<i>P.vivax</i> VK247	<i>P.vivax</i> like
Média	0.041	0.039	0.049	0.059	0.091
DP	0.022	0.023	0.019	0.020	0.032
M+2DP	0.085	0.085	0.087	0.099	0.155
M+3DP	0.107	0.108	0.106	0.119	0.187

M= Média das absorbâncias
DP= Desvio Padrão

Tabela 9: Valores do limiar de reatividade para os cinco peptídeos sintéticos, pelo emprego de 30 amostras de soros provenientes de área endêmica de malária, coletados no estado do Amapá.

Tabela 9					
Peptídeos	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P.malariae</i>	<i>P.vivax</i> VK247	<i>P.vivax</i> like
Média	0.075	0.067	0.067	0.071	0.119
Desvio	0.021	0.022	0.022	0.027	0.040
m+2DP	0.117	0.111	0.111	0.125	0.199
m+3DP	0.138	0.133	0.133	0.152	0.239

M= Média das absorbâncias
DP= Desvio Padrão
Descrição da técnica

Para executar o ELISA foram usadas placas de microtitulação de poliestireno da marca NUNC, que foram sensibilizadas por 15 horas a 4°C com 100µl de peptídeo sintético em PBS pH 7,2, cuja concentração ideal foi previamente determinada. Após cinco lavagens com solução de PBS pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), as placas foram bloqueadas com 200µl de PBS-T20, leite mólico desnatado a 5%, permanecendo por um período de duas horas à 37°C, em câmara úmida.

Após novo ciclo de lavagens com PBS-T, foram adicionados 100µl, dos soros nas diluições de 1/50, 1/100 e 1/200 em solução de leite a 1%, acrescidos dos controles positivos e negativos dos testes, com nova incubação a 37°C por uma hora em câmara úmida. Em seguida, as placas foram submetidas a um novo ciclo de lavagens.

Posteriormente, 100µl do conjugado peroxidase IgG humano, diluído em solução de leite a 1% em PBS foram adicionados à placa mantida por 30 minutos de incubação à 37°C em câmara úmida. As placas foram lavadas cinco vezes em solução de PBS-T e uma vez em água destilada, adicionando-se a seguir 100µl da mistura cromógena ABTS. Após 30 minutos, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50µl de SDS a 20% em água destilada. Os valores de absorbância são obtidos, após leitura das reações a 414 nm em leitor de ELISA (MULTISKAN MCC/340P). Os volumes acima referidos correspondem ao volume em cada cavidade da placa de ELISA. Todos os testes foram feitos em duplicata.

Para os testes de especificidade, foram usados peptídeos não relacionados.

4.4. Estudo Entomológico

4.4.1. Obtenção, identificação e acondicionamento dos anofelinos

Os anofelinos foram obtidos por de capturas entomológicas de 12 horas, em ambiente intradomiciliar e peridomiciliar, empregando-se a técnica de isca humana, visando a obtenção de dados para caracterização dos vetores possivelmente envolvidos na transmissão da malária local. Tais mosquitos foram capturados pela equipe de campo coordenada pelo Dr. Jaco Voorhan (pesquisador do Instituto Estadual de Pesquisa do Amapá-IEPA), que realiza o trabalho em colaboração com a autora deste estudo.

Nas capturas entomológicas foram preenchidas fichas contendo as seguintes informações: características do habitat, tipo de armadilha empregada, horário das coletas, número de exemplares obtidos, proximidade dos sítios de captura com residências, coleções hídricas ou mata.

Os anofelinos foram mortos com clorofórmio e em seguida acondicionados em tubos de vidro tipo hemólise contendo sílica gel, mantidos à temperatura ambiente até serem identificados e processados para a pesquisa de *P.vivax*, *P.vivax* VK 247, *P.vivax*-like humano, *P.malariae* e *P.falciparum*.

A identificação do subgênero *Nyssohynchus* foi realizada utilizando-se a chave taxonômica, segundo FARAN e LINTHICUM (1981). A chave de ROTRAUT e OLIVEIRA (1994) foi utilizada para os demais subgêneros.

4.4.2. Detecção da infecção malária nos anofelinos

Para a pesquisa de infecção malária nos anofelinos utilizou-se o ELISA. Foi necessário um estudo prévio obrigatório do teste, incluindo-se a produção de anticorpos monoclonais e padronização da técnica com os antígenos.

4.4.3. Padronização e Descrição do ELISA com os Anofelinos

4.4.3.1. Anticorpos monoclonais

O ELISA foi realizado empregando-se anticorpos monoclonais dirigidos contra as regiões repetitivas específicas do antígeno circunsporozoíta (CS) do *P.falciparum* (2A10) e *P.vivax* (2F2) (NARDIN et. al 1982), *P.vivax* VK247 (2E10) (ROSENBERG et. al 1989), *P.vivax* like/ *P.simiovale* (QARI et. al 1993 e *P.malariae* (6B10). (COCHRANE et. al 1992).

Estes anticorpos monoclonais foram produzidos seguindo protocolo de VENKATACHALAM et. al 1994 no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, partindo de hibridomas que foram doados pela Dra. Ruth Nussenzweig da Universidade de Nova York.

4.4.3.2. Antígenos utilizados como padrão positivo e negativo e obtenção dos esporozoítas

Como padrões positivos do ELISA foram utilizados peptídeos sintéticos, proteínas recombinantes ou esporozoítas de plasmódios:

Para a detecção do *P. vivax* VK 247, empregou-se esporozoítas obtidos de *An. stephensi* e *An. dirus* infectados por intermédio da alimentação em chimpanzés esplenectomizados e inoculados previamente com cepa isolada de paciente proveniente da Tailândia (ROSENBERG et. al 1989), ou o peptídeo sintético (ANGAGNQPG)₄ (COCHRANE et. al 1990). Os exemplares de *An.stephensi* e *An.dirus* infectados com *P.vivax* VK247 foram fornecidos pelo Dr. W.E.Collins do Centers for Diseases Control, Atlanta.

Para a detecção do *P. vivax* e *P. falciparum* utilizamos proteínas CS recombinantes produzidas partindo da transformação plasmídica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa 2168, na qual foi inserida parte dos genes que codificam as proteínas CS, que no caso do *P. vivax* corresponde aos resíduos de aminoácidos 77 a 335, contendo a região repetitiva (DDAAD)₉ (BARR et. al 1987) e no *P. falciparum* aos aminoácidos 43 a 348 contendo toda a região repetitiva (NANP)₃ (NARDIN et. al 1982). Na detecção do *P. malariae/ P. brasilianum*, utilizamos o peptídeo sintético [(NAAG)₄]₄ (COCHRANE et. al 1992 e para *P.vivax* like/ *P.simiovale* o peptídeo sintético (APGANQEGGAA)₃ com 33 aminoácidos contendo 11 aminoácidos repetitivos (QARI et. al 1993).

Nos testes de especificidade foram empregados além dos antígenos padrões positivos descritos acima, esporozoítas de *P. berghei* e *P. cynomolgi* obtidos de *An. stephensi* infectados experimentalmente na Universidade de Nova York.

Padrões negativos

Como controle negativo foram usados *An. stephensi* e *An. friborni* criados em insetário, mantidos em sala climatizada sob a temperatura de 26°C ± 1°C e umidade relativa do ar de 80% ± 5%. Os anofelinos foram fornecidos pela Dra. Ruth Nussenzweig da Universidade de Nova York.

Obtenção dos esporozoítas

Os esporozoítas foram obtidos pela metodologia descrita por OZAKI et. al (1984). O tórax e a cabeça de cada anofelino infectado em laboratório foram colocados em um tubo de plástico (tipo Eppendorf) de 0.5ml com o fundo furado com agulha e contendo lã de vidro, onde se adicionou 200 μ l de meio de cultura RPMI. O tubo foi colocado dentro de outro tubo Eppendorf de 1,5 ml, e em seguida centrifugado por 3 minutos a 1.500 rpm a uma temperatura de 5°C. O sobrenadante foi desprezado, e após os esporozoítas serem ressuspensos em meio RPMI, foram contados em câmara de Neubauer, calculando-se a concentração para cada espécie estudada. O procedimento descrito acima foi realizado em banho de gelo.

4.4.3.3. Conjugação do anticorpo monoclonal a biotina.

A conjugação dos AcMos à biotina foi efetuada com AcMo na concentração de 1,0 mg/ml diluída em PBS pH 7,2, acrescentando-se a cada 100 μ l, 10 μ l de solução de biotina previamente preparada em DMSO na concentração de 1,0 mg/ml.

Após incubação por 4 horas à temperatura ambiente, foram adicionados 11 μ l de cloreto de amônio 1M (diluído em PBS/BSA 1%), sob agitação. A solução foi dialisada duas vezes (24 horas cada) contra PBS pH 7,2.

Depois da biotinação de cada lote de AcMo, o teste para a verificação da concentração ótima de uso foi utilizado, titulando-se seriadamente o anticorpo monoclonal biotinilado. Placas de microtitulação foram sensibilizadas com o AcMo; após o bloqueio foram adicionados os antígenos controles positivos e negativos, em seguida, foram acrescentadas as diluições seriadas do AcMo biotinilado. Após a adição da peroxidase e do

substrato, a reação foi interrompida e em seguida foi realizada a leitura do nível de absorbância a 414 nm.

Esta padronização foi repetida para cada lote de AcMo biotinilado produzido ao longo dos experimentos.

4.4.3.4. Determinação das concentrações ideais dos anticorpos monoclonais e do conjugado imunoenzimático

Os AcMos utilizados na captura do antígeno e o conjugado estreptoavidina- peroxidase foram titulados simultaneamente, determinando-se as concentrações ótimas dos anticorpos e o título do conjugado imunoenzimático. Nesta padronização, foram usadas partidas de AcMo conjugadas com biotina, anteriormente, testadas em outro sistema.

As titulações foram efetuadas em bloco, testando-se paralelamente as concentrações de 0,125mg/ml, 0,25mg/ml, 0,5mg/ml, 1,0mg/ml, 2,5mg/ml, 5,0 mg/ml, 7,5mg/ml e 10,0mg/ml para os quatro anticorpos, frente às diluições do conjugado de 1/6000, 1/8000, 1/10000 e 1/12000, contra as concentrações dos controles positivos (peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes) a 0,25mg/ml, 0,5mg/ml, 1,0mg/ml e 2,0mg/ml e 12, 25, 50, 100, 200 e 400 (número de esporozoítas) e mosquitos negativos triturados, suspensos em PBS-T20, 1% BSA, na proporção de 1 ou 0,5 anofelino por 200 µl. As reações foram realizadas em duplicata.

4.4.3.5. Determinação das concentrações ideais de antígenos (proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos)

As concentrações ideais dos controles positivos empregados no ELISA foram avaliadas, diluindo-se seriadamente os antígenos nas placas de microtitulação.

Os ensaios foram realizados sensibilizando-se as placas com o AcMo na concentração ideal para cada espécie de plasmódio e após as lavagens e o bloqueio com PBS-T20, 5% BSA, acrescentaram-se as concentrações de 0,078mg/ml, 0,156mg/ml, 0,312mg/ml, 0,625mg/ml, 1,25mg/ml, 5,0mg/ml e 10,0mg/ml das proteínas recombinantes e dos peptídeos sintéticos, além dos padrões negativos. Em seguida, acrescentaram-se o AcMo biotinilado, peroxidase e substrato. As reações foram feitas simultaneamente e em duplicata.

4.4.3.6 Testes de especificidade

A especificidade foi verificada pela sensibilização das placas com 50 µl de anticorpo monoclonal (*P.falciparum*, *P.vivax*, *P.vivax* variante VK247, *P.malariae* e *P.vivax* like/simiovale), na concentração ideal para cada espécie estudada e após o bloqueio com 150µl de PBS-T20 BSA 5%, foram adicionados 30µl por cavidade do antígeno homólogo ou heterólogo ao anticorpo avaliado, além dos controles negativos.

Proteínas recombinantes do *P.falciparum* e *P.vivax*, peptídeos sintéticos e esporozoítas do *P. malariae* e *P.vivax* VK247 e esporozoítas do *P.cynomolgi* e *P.berghei* foram empregadas. Os testes foram feitos em duplicata.

4.4.3.7. Determinação do limiar de reatividade do ELISA para os anofelinos

O limiar de reatividade do teste imunoenzimático foi definido para cada uma das espécies de plasmódios estudadas, a partir de 100 fêmeas de *An. stephensi* criadas em laboratório, não infectadas, empregando-se a seguinte fórmula.

$$C.O. = X + 3 \text{ SD}$$

onde: X é a média aritmética do nível de absorbância.

4.4.4. Descrição do ELISA para anofelinos

O material a ser analisado no ELISA consistiu de mosquitos fêmeas que foram triturados individualmente utilizando-se motor elétrico com ponta de plástico, em 50 µl de solução de PBS pH 7,2 contendo albumina bovina a 1%, Nonidet P40 (0,5%) e os inibidores de protease antipaína (25µl/ml), leupeptina (25mg/ml) e aprotinina (1,7 unidades/ml). A cada tubo de triturado foram acrescentadas 150 µl de solução de PBS pH 7,2 contendo BSA 0,25%, e o material foi mantido a -20°C até ser processado. Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo.

Para executar o ELISA foram utilizadas placas de microtitulação de PVC (Dynatech Laboratories, Chantilly, Virginia, USA) sensibilizadas por 15 horas a 4°C com 50µl de anticorpo monoclonal (AcMo) em PBS pH 7,2, cuja concentração ideal foi previamente determinada. Após cinco lavagens com solução de PBS pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), as placas foram bloqueadas com 150µl de PBS-T20, BSA 5%, permanecendo por um período de duas horas a 37°C, em câmara úmida.

Após novo ciclo de lavagens com PBS-T, foram adicionados 30µl, da suspensão de mosquitos previamente triturados com nova incubação a 37°C por uma hora em câmara úmida. Em seguida, as placas foram submetidas a um novo ciclo de lavagens e 50µl do AcMo biotinilado previamente titulado na concentração adequada, foram adicionados em cada uma das cavidades da placa, permanecendo em câmara úmida, durante o período de duas horas à temperatura de 37°C. Em cada reação, foram utilizados antígenos padrões positivos e controles negativos.

O mesmo procedimento quanto às lavagens foi novamente realizado, adicionando-se, em seguida, 50µl de conjugado peroxidase ligados a estreptoavidina diluídos em PBS-T, BSA 1% a 1:8000. Após 30 minutos de incubação a 30°C em câmara úmida, as placas foram lavadas três vezes em solução de PBS-T e três vezes em água destilada, adicionando-se a seguir 50µl da mistura cromógena ABTS. Após 30 minutos, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50µl de SDS a 20% em água destilada. Os valores de absorbância foram obtidos depois da leitura das reações a 414 nm em leitor de ELISA (MULTISKAN MCC/340P).

Os volumes acima referidos correspondem ao volume em cada cavidade da placa de ELISA.

4.5. Métodos estatísticos

Os dados epidemiológicos foram organizados em um banco de dados (Dbase III) e posteriormente processados e analisados em um programa de Epidemiologia e Estatística (EPI INFO 6.0).

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa GraphPad-Prism, versão 3.0. Utilizamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As análises entre frequências foram feitas pelo teste de Qui-quadrado (X^2) com correção de Yates.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados da população humana

5.1.1. Resultados das Informações Epidemiológicas

Em relação a estratificação etária da população (tabela 10) observamos que dos 163 indivíduos participantes, 67 (41,1%) eram do sexo feminino e 96 (58,9%) masculino, sendo que 101 (61,96%) eram menores de 20 anos de idade.

Tabela 10 : Distribuição por faixa etária e sexo dos indivíduos entrevistados na região do rio Matapi, Amapá, março de 2000.

IDADE	SEXO		TOTAL	%
	Feminino	Masculino		
01 - 04	09	10	17	10,4
05 - 09	11	27	36	22,0
10 - 14	17	17	34	20,8
15 - 19	04	10	14	8,5
20 - 24	01	03	04	2,4
25 - 29	06	01	07	4,2
30 - 34	04	04	08	4,9
35 - 39	02	05	07	4,2
40 - 44	04	04	08	4,9
45 - 49	02	08	10	6,1
50 - 54	02	01	03	1,8
55 - 59	01	03	04	2,4
60 - 64	01	00	01	0,6
65 - 69	01	00	01	0,6
> 69	01	00	01	0,6
Não sabe a idade	01	03	04	2,4
TOTAL	67	96	163	100,0

A tabela 11 apresenta as principais atividades econômicas desenvolvida pela população. A ocupação mais encontrada refere-se às atividades agrícolas, exercidas por 23 pessoas (14,1%), seguida pelas donas de casa 7 (4,29%). A grande maioria dos entrevistados 122 (74,8%) não declarou nenhuma ocupação por tratar-se de indivíduos menores de idade ou idosos.

Tabela 11: Atividades econômicas desenvolvidas pela população residente na região do rio Matapi, Amapá, março 2000.

Ocupação	Frequência	%
Agricultor	23	14,1
Barqueiro	01	0,6
Carpinteiro	01	0,6
Caseiro	02	1,2
Dona de casa	07	4,2
Dono de pesqueiro	01	0,6
Professor	03	1,8
Servente	01	0,6
Trabalhador braçal	01	0,6
Vaqueiro	01	0,6
Não desenvolve atividade econômica	122	74,8
TOTAL	163	100,0

No que diz respeito a distribuição dos indivíduos por localidade, 40 (24,54%), residiam em São João, 74 (45,40%) em São Raimundo e 49 (30,06%) em Santo Antônio. Somente três dos entrevistados eram procedentes de outras regiões. Tratavam-se dos professores das três localidades. Um, era proveniente de Pernambuco e duas do Município de Macapá, AP.

No tocante ao conhecimento da malária, toda a população conhecia o meio de transmissão natural da doença, os sintomas e as possíveis formas de evitar o contato com o vetor.

O emprego de medidas profiláticas foi visto em 87,2% dos moradores protegidos por mosquiteiros em suas redes de dormir. Uma única família colocou tela contra insetos na janela e porta da casa. Nenhum membro da comunidade mencionou utilizar quimioprofilaxia. O motivo alegado para a falta de mosquiteiros junto aos demais moradores deveu-se ao seu alto custo, cerca de trinta reais (na época de estudo).

A presença de malária anterior foi relatada por 86 indivíduos (52,76%), sendo que 73,3% disseram terem contraído a doença nos últimos seis meses. Os demais foram acometidos há mais de cinco anos. Cerca de 10% das pessoas relataram, cada uma, 10 ou mais episódios de malária. Pouco acima da metade das pessoas (52,8%) conhecia a espécie de *Plasmodium* que as haviam acometido: *P. vivax* (70%) e *P. falciparum* (30%). Dos entrevistados, 76,7% obtiveram diagnóstico pro meio da Fundação Nacional da Saúde. Os demais desconheciam o serviço de saúde que realizou o diagnóstico.

Ao analisarmos a movimentação da população das três localidades, verificamos que raramente as pessoas se deslocam para lugares mais afastados. Eventualmente um morador se dirige ao município de Santana para fazer compras ou ir ao hospital. O principal motivo que dificulta o deslocamento é a falta de meio de transporte na região

Com exceção das crianças, toda a população entra na mata para desenvolver alguma atividade, seja de caça, extração vegetal para alimentação diária ou, no caso dos homens, para lidar com a criação de búfalos. As crianças maiores de cinco anos entram na mata para caçar passarinhos e pegar frutas.

As atividades de lazer citadas pela população resumem-se em freqüentar a igreja ou ir a um pequeno bar situado em São Raimundo. As crianças brincam no peri-domicílio à beira do rio.

5.1.2.1. Resultados da gota espessa e do esfregaço sangüíneo

Os resultados do exame da gota espessa e do esfregaço sangüíneo dos 163 indivíduos pesquisados, revelaram 14 casos positivos para malária. Sete deles, causados por *P. falciparum*, seis pelo *P. vivax* e um malária associada (*P. falciparum* + *P.vivax*), conforme mostra a tabela 12.

Tabela 12: Resultado do teste da gota espessa e esfregaço sangüíneo da população residente nas localidades de São Raimundo de Pirativa, São João e Santo Antônio, Amapá, março 2000.

Espécies de Plasmodium			
Localidades	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P.f + P.v</i>
São Raimundo (n=74)	2/74 (2,70%)	4/74 (5,40)	0 (0,0%)
São João (n=40)	2/40 (5,00%)	1/40 (2,50%)	1/40 (2,5%)
Santo Antônio (n=49)	3/49 (6,12%)	1/49 (2,00%)	0 (0,0%)
Total (n=163)	7/163 (4,29%)	6/163 (3,68)	1/163 (0,61%)

P.f.+ P.v = P.falciparum + P.vivax

As parasitemias dos pacientes das três localidades estão mostradas na tabela 13. Dentre os seis acometidos pelo *P. vivax* apenas um, relatou algum sintoma de malária. No caso do *P. falciparum*, quatro apresentaram sintomas.

Tabela 13: Resultado das parasitemias obtidas no teste da gota espessa da população residente nas localidades de São Raimundo, São João e Santo Antônio, Amapá, março 2000.

Espécies de <i>Plasmodium</i>		
Localidade/ Identificação do paciente	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>
São Raimundo		
Paciente 1	24.640 parasitas/ mm ³ sangue	(-)
Paciente 2	32.380 parasitas/ mm ³	(-)
Paciente 3	(-)	(++)
Paciente 4	(-)	(+)
Paciente 5	(-)	(+++)
Paciente 6	(-)	(++)
São João		
Paciente 7	15.000 Parasitas/ mm ³ sangue	(-)
Paciente 8	6.000 Parasitas/ mm ³ sangue	(-)
Paciente 9	(-)	(++)
Paciente 10	2.400 Parasitas/ mm ³ sangue	(+)
Santo Antônio		
Paciente 11	64.240 Parasitas/ mm ³ sangue	(-)
Paciente 12	43.000 Parasitas/ mm ³ sangue	(-)
Paciente 13	1.280 Parasitas/ mm ³ sangue	(-)
Paciente 14	(-)	(++)

(-) Negativo

5.1.3. Resultados dos testes Imunológicos com os soros

5.1.3.1. Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta

As freqüências com antígenos de *P. vivax* para anticorpos das classes IgG e IgM, respectivamente foram: em Santo Antonio 70,8% (17/24) e 20,0% (5/24), em S. João 50,0% (07/14) e 14,3% (2/14) e na localidade de S. Raimundo 80,0% (28/35) e 11,42% (4/35). Em relação as prevalências dos anticorpos das classes IgG e IgM do *P. falciparum*, obtivemos: Santo Antonio 29,1% (7/24) e 20,8% (5/24), S. João 28,6% (4/14) e 14,3% (2/14) e São Raimundo 80% (28/35) e 14,3% (5/35). (tabela 14)

Tabela 14: Prevalência de anticorpos da classe IgG e IgM contra antígenos de formas sangüíneas (assexuadas) de *P.vivax* e *P.falciparum* para o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) com soros das populações de São Raimundo de Pirativa, São João e Santo Antônio, estado do Amapá, março de 2000.

ANTÍGENOS				
LOCALIDADES	Imunoglobulina IgG		Imunoglobulina IgM	
	<i>P.vivax</i>	<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>	<i>P.falciparum</i>
Santo Antonio (n=24)	70,8% (17/24)	29,1% (7/24)	20,8% (05/24)	20,8% (5/24)
São João (n=14)	50,0% (07/14)	28,6% (04/14)	14,3% (02/14)	14,3% (02/14)
São Raimundo (n=35)	80,0% (28/35)	31,4% (11/35)	11,4 (04/35)	14,3% (05/35)
TOTAL (n=73)	71,2% (52/73)	30,1% (22/73)	16,0% (11/73)	16,4% (12/73)

Figura 8 : Distribuição dos títulos das reações de IFI para anticorpos IgG e IgM de *P. falciparum* e *P. vivax* da população residente na região do rio Matapí, março 2000.

Figura 8

5.1.3.2. Resultado do ELISA com os soros humanos

As prevalências totais de reações positivas para a proteína CS em ELISA calculadas a partir dos limiares de reatividade obtidos com 30 amostras de soros de área endêmica de malária foram: *P.vivax* 38,4% (28/73), *P.falciparum* 26% (19/73), *P.malariae* 36,7% (27/73), *P.vivax* VK 247 20,5% (15/73) e *P.vivax* like 17,8% (13/73).

Os resultados obtidos a partir dos limiares de reatividade usando soros de Banco de Sangue de São Paulo foram: *P.vivax* 45,2% (33/73), *P.falciparum* 43,8% (32/73), *P.malariae* 49,3% (36/73), *P.vivax* VK 247 36,9% (27/73) e *P.vivax* like 28,7% (21/73).

Conforme o esperado as prevalências obtidas com os limiares estabelecidos com os soros do Banco de Sangue de São Paulo foram mais elevadas do que com os soros de área endêmica. Consideramos em nossa análise final de prevalências, os limiares estabelecidos com soros de área endêmica e a média das absorbâncias acrescida de três desvios padrão.

Na tabela 15 estão demonstradas as frequências de anticorpos da classe IgG contra a região repetitiva da proteína CS para os cinco peptídeos com os 73 soros testados das três localidades trabalhadas.

Tabela 15: Prevalência de anticorpos da classe IgG contra região repetitiva da Proteína CS de *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* VK247 e *P. vivax* like, da população residente em São Raimundo de Pirativa, São João e Santo Antonio, março de 2000.

ANTÍGENOS					
	<i>P. vivax</i>	<i>P.falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i> VK247	<i>P.vivax</i> like
AMOSTRAS					
São Raimundo (n=35)	31,4% (11/35)	14,3% (05/35)	31,4% (11/35)	22,9% (08/35)	20,0% (07/35)
Santo Antônio (n=24)	50,0% (12/24)	41,7% (10/24)	37,5% (9/24)	16,7% (04/24)	25,0% (06/24)
São João (n=14)	35,7% (05/14)	28,6% (04/14)	50,0% (07/14)	21,4% (03/14)	0% (0/14)
TOTAL (n=73)	38,4% (28/73)	26,0% (19/73)	36,9% (27/73)	20,5% (15/73)	17,8% (13/73)

P.vivax :Limiar de reatividade 0,138.
P .falciparum: Limiar de reatividade 0,133.
P.malariae: Limiar de reatividade 0,133.
P.vivax (VK247): Limiar de reatividade 0,152.
P.vivax-like: Limiar de reatividade 0,239.

Apesar do número de amostras positivas ser pequeno, comparamos as possíveis diferenças em relação as absorbâncias obtidas nos soros dos indivíduos, para as diferentes espécies de *Plasmodium*, nas três localidades por nós trabalhada.

Embora alguns soros tenham apresentado absorbâncias mais elevada para um dado peptídeo numa determinada localidade em relação à outra, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada. Exceto em relação à soropositividade de *P.malariae* nos soros coletados em São João e do *P. falciparum* em Santo Antônio ($p < 0.05$).

Nas figuras 9 10 e 11 verificamos a distribuição das absorbâncias obtidas com os soros testados pelo ELISA com cada um dos peptídeos nas três comunidades estudadas.

Figura 9. Distribuição das absorbâncias obtidas em ELISA à 414 nm com os peptídeos CS de *P. falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv), *P. malariae* (Pm), *P.vivax* VK 247 (PVK) e *P. vivax* like para a população de São Raimundo, Amapá - Março 2000.

As barras indicam o limiar de reatividade para cada peptídeo.

***P.falciparum*: 0,138.**

***P.vivax* e *P.malariae*: 0,133.**

***P.vivax* VK 247: 0,152.**

***P.vivax* like: 0,239.**

Figura 10: Distribuição das absorbâncias a 414 nm obtidas em ELISA com soros da população de São João, Amapá - Março 2000.

As barras indicam o limiar de reatividade para cada peptídeo.
P.falciparum: 0,133; *P.vivax* e *P.malariae*: 0,133; *P.vivax* VK 247: 0,152 e *P.vivax* like: 0,239.

Figura 11: Distribuição das absorbâncias a 414 nm obtidas em ELISA com soros da população de Santo Antônio, Amapá - Março 2000.

As barras indicam o limiar de reatividade para cada peptideo.
P. falciparum: 0,133; *P. vivax* e *P. malariae*: 0,133; *P. vivax* VK 247: 0,152 e
P. vivax like: 0,239.

5.2. Resultados do estudo entomológico

5.2.1. Coleta e identificação dos anofelinos

Os anofelinos foram obtidos por meio de capturas entomológicas em ambiente intradomiciliar e peridomiciliar, empregando-se a técnica de isca humana, visando a obtenção de dados para caracterização dos vetores possivelmente envolvidos na transmissão da malária local.

As coletas foram realizadas no período compreendido entre os meses de maio a novembro de 1999 em três localidades situadas ao longo do Rio Matapí, São Raimundo do Pirativa, Santo Antonio e São João, em 3 dias consecutivos, uma vez por mês, por 13 horas.

As espécies mais abundantes foram *An. darlingi* e *An. albitarsis*., (cerca de 95% dos anofelinos capturados), as demais espécies foram *An. oswaldoi*, *An. braziliensis*, *An. nuneztovari* e *An. triannulatus*.

Em relação ao *An. albitarsis*, embora não tenhamos realizado uma análise molecular dos espécimes para a verificação exata de cada membro do complexo assim, ao ser citado o termo *An albitarsis*, trata-se do *An albitarsis s.l.* que possivelmente trata-se do *An. marajoara*, tendo em vista os trabalhos realizados no estado do Amapá por SEGURA 1998, porém é necessário uma avaliação criteriosa, para comprovar esta informação.

Os dados apresentados na tabela 28, referem-se a distribuição do *An. darlingi* e *An. albitarsis*, capturados no período de maio a outubro de 1999 nas localidades de São Raimundo de Pirativa, São João e Santo Antônio, Município de Santana, Amapá.

Tabela 16: Distribuição do *An. darlingi* e *An. albitarsis*, capturados em três capturas consecutivas no período de maio a outubro de 1999 na região do rio Matapí, Amapá.

Data das Coletas	<i>An.darlingi</i>	<i>An.. albitarsis</i>	<i>An. darlingi</i> Total	<i>An. albitarsis</i> Total
4/5/99	49	657	229	1.500
5/5/99	107	481		
6/5/99	73	362		
31/5/99	429	316	1.436	1.709
1/6/99	483	412		
2/6/99	524	981		
30/6/99	1001	256	3.320	734
1/7/99	1040	269		
2/7/99	1279	209		
28/7/99	2724	281	7.908	656
29/7/99	2425	189		
30/7/99	2759	186		
30/8/99	958	72	2.823	366
31/8/99	948	133		
1/9/99	917	161		
27/9/99	760	119	2.152	438
28/9/99	779	181		
29/9/99	613	138		
26/10/99	664	212	1.558	370
27/10/99	375	87		
28/10/99	519	71		
Total			19.424	5.773

Observamos na Tabela 16 que *An. darlingi* foi a espécie mais capturada ao longo do trabalho, totalizando 19.424 exemplares, atingindo a maior quantidade no início do mês de julho, às quais totalizaram 7.908 mosquitos nas 3 noites consecutivas. O menor número de exemplares desta espécie, foi capturado no início de maio, com somente 229 mosquitos.

Em relação a ocorrência do *An. albitarsis* foram capturados 5.773 espécimens, no total das capturas, sendo que as maiores abundância foram verificadas no início de maio e junho com 1.500 e 1.709 exemplares, respectivamente. A menor quantidade foi obtida no final de outubro onde se capturou 370 mosquitos

Figura 12 : Distribuição do *An. darlingi* e *An. albitarsis*, capturados em três capturas consecutivas no período de maio a outubro de 1999 na região do rio Matapi, Amapá.

5.2.2. Resultados da padronização do ELISA com os anofelinos

5.2.2.1. Determinação das concentrações ideais dos anticorpos monoclonais e do conjugado imunoenzimático

Para a escolha das concentrações protéicas ideais dos monoclonais usados para a sensibilização das placas de microtitulação e diluições ótima do conjugado estreptoavidina- peroxidase à ser empregado no ELISA, foram efetuadas as diversas titulações em bloco, testando-se paralelamente as diluições crescentes dos anticorpos monoclonais contra diluições crescentes dos controles positivos e negativos, mantendo-se constantes as concentrações dos anticorpos monoclonais, previamente biotinilados.

A concentração ótima para uso foi de 1,0µg/ml do monoclonal que era utilizado como anticorpo de captura do antígeno, para os cinco tipos de plasmódios, com o conjugado diluído à 1/8000 para os peptídeos de *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.vivax* VK247 e 1/12000 para os peptídeos de *P.vivax* like e *P.malariae*.

5.2.2.2. Determinação das concentrações ideais dos antígenos (proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos)

Como padrões positivos do ELISA- captura foram utilizados peptídeos sintéticos, proteínas recombinantes ou esporozoítas de plasmódios.

Para *P. vivax* VK 247, empregamos esporozoítas obtidos de *An. stephensi* e *An. dirus* na concentração de 50 esporozoítas/ ml. Para *P. vivax* e *P. falciparum* utilizamos proteínas CS recombinantes na concentração de 1,0 µl/ml, enquanto que as melhores concentrações obtidas para *P. malariae*/ *P. brasilianum*, com o peptídeo sintético [(NAAG)₄]₄ foi de 100 µg/m. tanto quanto para *P.vivax* like/ *P.simiovale*.

5.2.2.3. Testes de especificidade

Neste teste foram usadas como antígeno as proteínas recombinantes do *P.falciparum* e do *P.vivax*, os peptídeos sintéticos e esporozoítas do *P. malariae* e do *P.vivax* VK247 e os esporozoítas do *P.cynomolgi* e *P.berghei*.

Verificou-se que os níveis de absorbância obtidos foram inferiores ao limiar de positividade da reação, quando se empregou antígeno heterólogo a cada um dos monoclonais. Não foram observadas reações cruzadas entre um monoclonal dirigido à determinada espécie de plasmódio quando colocado para reagir com antígeno CS de espécies heterólogas do parasita.

5.2.2.4. Determinação do limiar de reatividade no teste ELISA com os anofelinos

O limiar de reatividade do ELISA foi calculado para cada plasmódio a partir de 100 mosquitos negativos, criados em insetário, adicionando-se 3 desvios padrões à média aritmética do nível de absorbância, realizados em diferentes ensaios.

$$C.O. = X + 3 SD$$

onde: X é a média aritmética das absorbâncias dos espécimes

As médias aritméticas das absorbâncias para *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.vivax* VK 247 e *P. vivax*like foram, respectivamente, 0,132, 0,152, 0,206, 0,182 e 0,312 com desvio padrão de 0,017, 0,024, 0,039, 0,046 e 0.035. Obtendo os limiares de reatividade de 0,183, 0,225, 0,323 e 0,322 e 0,234, respectivamente.

Tabela 17: Valores do limiar de reatividade para *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.vivax* VK247 e *P.vivax* like, pelo emprego de 100 exemplares de *An. stephensi* criados em laboratório, não infectados.

Peptídeos	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P.malariae</i>	<i>P.vivax</i> VK247	<i>P.vivax</i> like
Média	0,132	0,152	0,206	0,182	0,312
DP	0,017	0,024	0,039	0.046	0.035
M+3DP	0,183	0,225	0,323	0,322	0,234

M= Média das absorbâncias

DP= Desvio Padrão

5.3. Resultados do ELISA com os anofelinos

5.3.1. Resultados da infectividade do *An. darlingi* pelo diferentes *Plasmodium*

O ELISA para *An. darlingi* com os cinco tipos de *Plasmodium* resultou que dos 9.450 *An. darlingi* processados 6 anofelinos foram positivos para o *P.falciparum*, 11 para *P.vivax*, 57 para *P.vivax* VK247, 97 para *P.vivax* like e 4 para *P.malariae*.

Tabela 18: Positividade do *An. darlingi* infectado por *P. falciparum*, *P.vivax*, *P.vivax* VK247, *P.vivax/like* e *P. malariae* pelo ELISA, coletados na região do rio Matapi, Amapá no período de maio a outubro de 1999.

Espécies de <i>Plasmodium</i>						
	Número de mosquitos testados	<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>	<i>P.vivax</i> VK247	<i>P. vivax</i> like	<i>P. malariae</i>
Captura 1	150	0	0	0	0	0
Captura 2	1.000	3	0	5	9	0
Captura 3	1.500	0	3	7	22	0
Captura 4	3.000	3	0	9	4	1
Captura 5	1.500	0	5	21	20	3
Captura 6	1.500	0	3	15	29	0
Captura 7	800	0	0	0	13	0
Total	9.450	6	11	57	97	4

Determinado por ELISA utilizando anticorpos monoclonais 2A10 para *P. falciparum*, 2F2 para *P.vivax*, 2E10 para *P. vivax* VK247 e 6B10 para *P. malariae*.

Figura 13

Figura 13: Positividade do *An. darlingi* infectado mensalmente pelo *P. falciparum* (PFT), *P. vivax* (PVT), *P. vivax VK247* (PKT), *P. vivax/like* (PLT) e *P. malariae* (PMT) pelo ELISA, coletados na região do rio Matapí, Amapá, maio a outubro de 1999.

5.3.2. Resultados da infectividade do *An. albitarsis* pelos diferentes plasmódios

O ELISA para *An. albitarsis* com os cinco tipos de *Plasmodium* resultou que dos 3.523 *An. albitarsis* processados 7 anofelinos foram positivos para o *P.falciparum*, 4 para *P.vivax*, 21 para *P.vivax* VK247, 21 para *P.vivax* like e 4 para *P.malariae*.

Espécies de <i>Plasmodium</i>						
	Número de mosquitos testados	<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>	<i>P.vivax</i> VK247	<i>P. vivax</i> like	<i>P. malariae</i>
Captura 1	762	0	0	7	3	0
Captura 2	762	3	0	5	4	2
Captura 3	700	1	0	0	1	0
Captura 4	599	3	3	3	2	0
Captura 5	200	0	1	2	2	0
Captura 6	250	0	0	4	5	2
Captura 7	250	1	0	0	4	0
Total	3523	7	4	21	21	4

Determinado por ELISA utilizando anticorpos monoclonais 2A10 para *P. falciparum*, 2F2 para *P.vivax*, 2E10 para *P. vivax* VK247 e 6B10 para *P. malariae*.

Figura 14

Figura 14: Positividade do *An. albitarsis* infectado mensalmente pelo *P. falciparum* (PFT), *P.vivax* (PVT), *P.vivax* VK247 (PKT), *P.vivax/like* (PLT) e *P. malariae* (PMT) pelo ELISA, coletados na região do rio Matapí, Amapá, maio a outubro de 1999.

Figura 15

* P<0.05

PF= *P.falciparum*

PV= *P.vivax*

PK= *P. vivax* VK247

PL= *P.vivax* like

PM= *P.malariae*

Figura 15: Proporção de *An. albitarsis* e *An. darlingi* infectados com os diferentes plasmódios em relação ao total de anofelinos processados na região do rio Matapí, AP.

6. DISCUSSÃO

A malária é uma doença complexa cuja transmissão envolve interações entre os parasitas, hospedeiros humanos e animais, vetores e o meio ambiente. O desconhecimento dessas interações e fatores sócio-econômicos e políticos limitam a implementação de um controle efetivo e sustentável.

A atual estratégia no Brasil baseia-se no Plano de Intensificação das Ações de Controle de Malária na Amazônia Legal (FUNASA 2000, vide Introdução, pág. 14). Verifica-se na prática que o programa é mantido basicamente por ações voltadas a aspectos antropocêntricos, por meio do diagnóstico e tratamento precoce de casos sintomáticos, enquanto as atividades direcionadas ao controle dos insetos, quando estabelecidas, baseiam-se exclusivamente na presença de um vetor hipotético.

A presença de malária assintomática causada pelo *P.vivax* na América do Sul (ANDRADE et. al 1995; ZIMMERMAN e VOORHAM 1997; PAHO 1998), provavelmente relacionada à baixa sensibilidade dos testes laboratoriais (principalmente em pacientes com baixa parasitemia), contribui para a imprecisão dos dados notificados. Por tratarem-se de um sistema de notificação lento, impreciso e centralizado, os serviços de saúde, na maioria das vezes, não oferecerem um nível de qualidade satisfatório o bastante para detectar os casos tão rapidamente quanto o seu surgimento. Sendo assim, possivelmente, a incidência real da malária está subestimada e seu controle negligenciado.

Ao analisarmos o número de casos de malária no Estado do Amapá, verificamos que houve um aumento surpreendente de 85% na notificação de casos de *P.vivax* a partir de 1993 (figura 1). Voorham (comunicação pessoal) comparou os dados de notificação da área no período de junho/1998 a novembro/1999 com o número de lâminas coletadas/mês em relação ao tamanho da população e constatou que o número de casos detectados

variou consideravelmente. Possivelmente estes dados refletiram negativamente sobre a precisão da notificação da malária neste Estado.

A partir destas considerações, questionamentos mais direcionados à melhoria do diagnóstico foram formulados. Uma das perguntas iniciais do nosso trabalho foi com relação ao sistema de notificação passiva. Seria este sistema adequado para ser utilizado em pesquisas e para monitorar intervenções de controle?

A resposta surgiu a partir dos nossos resultados, obtidos no exame parasitológico por meio de busca ativa. Dentre os 163 indivíduos estudados, surpreendeu-nos o encontro de 14 casos positivos de malária (*P.f* n=7, *P.v* n=6 e *Pf+Pv* n=1).

Enquanto os dados de notificação da área mostraram casos esporádicos de *P. falciparum*, em nosso estudo foram encontrados 57% de casos positivos para esta espécie de plasmódio. Estes resultados nos alertaram sobre a baixa sensibilidade do diagnóstico por meio da busca passiva.

Exemplificando: em nossos estudos, das sete infecções por *P. falciparum*, os dois casos sem sintomatologia clínica, apresentaram parasitemias elevadas (43 mil e 64 mil parasitas/mm³ sangue). Portanto, a dificuldade no registro de notificações de casos de *P. falciparum* evidencia uma deficiência no sistema utilizado para obtenção de dados confiáveis.

Os dados relativos à notificação dos casos de malária ocorridos em 1997 por sexo e faixa etária indicam que naquele ano os valores foram significativamente maiores em homens entre 20 e 49 anos. Em contraste com esta informação, nossos resultados apontam que 12 dos 14 casos detectados durante a busca ativa, envolvem indivíduos com idade abaixo dos 15 anos. Nossos resultados coincidiram com os relatados por CAMARGO et. al (1999). Estes autores estudaram a epidemiologia da

malária em Portuchuelo, uma região ribeirinha em Rondônia, e encontraram maior prevalência da doença em crianças, menores de 16 anos.

Na área por nós trabalhada, a maioria dos indivíduos residentes, relataram ausência de sintomatologia para malária. Este fato pode, eventualmente, relacionar-se com fatores genéticos capazes de influenciar na transmissão da malária, como a ausência de antígenos de superfície relacionados ao fator Duffy e também à existência das hemoglobinopatias tais como as anemias causadas pela presença da Hemoglobina S, entre outras (MONTROYA et. al 1994).

Tendo em vista que a presença desses fenótipos predomina em populações de etnia africana e que as três comunidades onde trabalhamos são constituídas principalmente por membros deste grupo, o reconhecimento da influência de ambos os fatores na incidência da doença, poderiam elucidar alguns aspectos sobre a dinâmica de transmissão local.

No Suriname, a alta frequência do fenótipo Fy (a-b-) na população residente no interior foi um determinante importante para a distribuição das espécies de plasmódios (VOORHAM et. al 1993). Informações desta natureza são escassas em populações brasileiras. Uma pesquisa sobre estes fenótipos foi realizada por COLAUTO et. al (1981) em população ribeirinha no Estado do Amazonas. O fenótipo Fy (a-b-) foi encontrado em 12% dos moradores e em 3% de uma comunidade indígena. Como o objetivo deste trabalho não foi caracterizar os fenótipos destas populações, achamos que seria interessante estudar este aspecto nas populações ribeirinhas descritas por nós como um desdobramento futuro deste trabalho.

Uma vez que os dados obtidos exclusivamente da população humana são contestáveis diante da impossibilidade de correlacionar sintomas clínicos e status parasitológico (BURKOT e GRAVES 1995), o emprego de Parâmetros Entomológicos de Transmissão e o diagnóstico humano poderiam complementar-se mutuamente. Diversos autores demonstraram a hipótese da existência de uma relação entre os Parâmetros Entomológicos e

a incidência da malária (RUBIO-PALIS 1994a; HAY et. al 2000; LINDBLADE et. al 2000).

A potencialidade de um anofelino transmitir malária é estimada baseando-se no modelo de transmissão de MacDonald (MACDONALD 1957), cujos componentes referem-se a: número de picadas por pessoa por dia, antropofilia, duração do ciclo gonotrófico, sobrevivência diária do anofelino e duração do período extrínseco de incubação do *Plasmodium*. Estes fatores definem o modelo clássico de Capacidade Vetorial de GARRETT-JONES (1964) e mede o grau de potencial contato infeccioso (MOLINEAUX 1978).

A Taxa de Inoculação Humana é um dos parâmetros bastante empregados, principalmente na África (BEIER et. al 1994,1999; HAY et. al 2000). Outro parâmetro é a relação entre Índice de Antropofilia e Taxa de Esporozoítas (CATTANI et. al 1986), cujo resultado apontou uma relação direta entre as duas variáveis em *An. punctulatus*. Nas Américas, os trabalhos desta natureza são escassos. A variável mais usada é a que mede a densidade do vetor em relação ao número de mosquitos coletados no ato de pousar para se alimentar no homem (RUBIO-PALIS e CURTIS 1992; ZIMMERMAN 1992).

Até este momento, estamos apenas aferindo a relação entre possíveis vetores, antropofilia e taxas de infecção. Nenhum destes estudos, porém, esclarece-nos sobre a infecção vetorial e sua capacidade e competência de transmitir a doença. Com relação à incriminação vetorial, são empregados métodos capazes de determinar a taxa de esporozoítas (pela dissecação das glândulas salivares ou pelo ELISA) (ZIMMERMAN 1992; BRANQUINHO et. al 1993; CONN et. al *in press*).

O ELISA utilizado na detecção da infectividade em anofelinos oferece várias vantagens. No entanto é necessário que a interpretação dos resultados seja avaliada de forma criteriosa. O fato do teste detectar a proteína circunsporozoíta, presente em esporozoítas, e também nos oocistos, pode levar a uma falsa incriminação vetorial.

Sabe-se que desenvolvimento dos esporozoítas não ocorre de forma sincrônica. Os oocinetos podem ser formados, mas não se desenvolver até o estágio de oocistos. Estes últimos por sua vez podem ser produzidos, porém não gerar esporozoítas em seu interior. Ainda, os esporozoítas formados podem ser incapazes de invadir as glândulas salivares. Na tentativa de minimizar este problema, alguns autores empregam mosquitos cortados transversalmente no tórax, entre o primeiro e o terceiro pares de pernas e a porção anterior, retirando as asas e as pernas. Procuram assim, assegurar que a positividade encontrada seja ocasionada por oocistos ou esporozoítas.

Tal procedimento simplesmente minimiza a possibilidade de contaminação, uma vez que, com o rompimento do oocisto maduro os esporozoítas encontrados no seu interior são liberados na hemolinfa, e em seguida, difundem-se para toda a hemocele onde eventualmente concentram-se dentro das glândulas salivares.

Os esporozoítas podem ser encontrados em diferentes regiões do anofelino: por toda a hemolinfa, em oocistos e dentro da glândula salivar. ROBERT et. al (1988) verificaram a positividade do *An. gambiae* pelo ELISA em diferentes regiões do corpo do inseto, experimentalmente infectado pelo *P. falciparum*. Os pesquisadores realizaram dissecções isolando a cabeça, as glândulas salivares, os túbulos de Malpighi, os tecidos abdominais, o tórax, o estômago, as asas e as pernas dos anofelinos e posteriormente os testaram por ELISA, encontrando positividade em todas as regiões mencionadas.

Trabalhos relacionados com estudos de competência vetorial desenvolvidos em Rondônia, na região de Costa Marques, por KLEIN et. al (1991 a, 1991 b) contribuíram de maneira significativa, apontando as dificuldades na interpretação dos resultados do ELISA e na verificação da infectividade de anofelinos. Os autores realizaram testes de suscetibilidade com várias espécies de anofelinos criados em laboratório e alimentados em pacientes com gametócitos. *An. darlingi* e *An. oswaldoi* apresentaram poucos esporozoítas nas glândulas salivares e muitos oocistos na parede do

estômago, enquanto *An. deaneorum* apresentou alta positividade, mostrando ser mais sujeito à infecção quando comparado ao *An. darlingi*. Em relação à suscetibilidade à infecção, o *An. albitarsis* apresentou oocistos de *P. falciparum*, porém não houve invasão das glândulas salivares pelo esporozoítas.

RUBIO-PALIS et. al (1994a) realizaram um estudo extremamente relevante sobre Capacidade Vetorial do *An. nuneztovari*, *An. albitarsis s.l.* e *An. triannulatus* na Venezuela ocidental. Os pesquisadores demonstraram que os parâmetros relativos ao índice de antropofilia, densidade populacional e paridade e antropofilia e paridade contribuíram com mudanças na Capacidade Vetorial dessas espécies. Os resultados apontaram que o declínio na incidência de malária (de 41,1 para 7,5 por mil) no período de um ano deveu-se à diminuição da Capacidade Vetorial das referidas espécies.

As pesquisas acima ilustram a importância do uso de Parâmetros Entomológicos para o entendimento da dinâmica de transmissão da malária. Entretanto a presença de heterogeneidade anofélica numa mesma área dificulta o uso dos parâmetros entomológicos rotineiramente avaliados.

A presença de mais de uma espécie agindo como vetor primário e secundário na mesma área geográfica foi verificada por HAYES et. al (1987), HERRERA et. al (1987), LOUNIBOS e CONN (2000). Estes trabalhos ressaltam a necessidade do conhecimento da participação de cada uma das espécies na transmissão da malária.

Um exemplo tipicamente brasileiro diz respeito ao *An. darlingi*, principal espécie transmissora nas extensas áreas da região amazônica, e sua coexistência com outras espécies anofélicas (ARRUDA et. al 1986; OLIVEIRA-FERREIRA et. al 1990; BRANQUINHO et. al 1993; PÓVOA et. al 1993, SEGURA 1998; PÓVOA et. al 2001; CONN et. al *in press*). *Anopheles albitarsis s.l.*, por exemplo, foi considerado um vetor de importância relativa em áreas restritas do Brasil (DEANE 1986). Atualmente a espécie apresenta um papel significativo na transmissão da malária, coexistindo com o vetor

primário *An. darlingi* e outros vetores secundários (SEGURA 1998). O mesmo pode ser dito sobre outros anofelinos (BRANQUINHO et. al 1993).

Portanto é de fundamental importância ir além da incriminação vetorial, examinando a complexidade da associação das múltiplas espécies, assim como esclarecer o papel desempenhado pelas espécies crípticas na transmissão da malária. Além disso, é extremamente necessário realizar um mapeamento dos anofelinos em microrregiões, incluindo-se áreas recém-desmatadas, posto que a substituição das espécies anofélicas relaciona-se às mudanças no meio ambiente e a plasticidade genética dos mosquitos em se adaptar a estas mudanças.

Por exemplo, no trabalho que desenvolvemos no Acre observamos que nas coletas realizadas em 1991 houve predomínio de *An. oswaldoi* (85%) e *An. deaneorum* (15%). Ao voltarmos mesma área em 1994, encontramos: *An. albitarsis*, *An. deaneorum*, *An. rangeli*, *An. oswaldoi*, *An. darlingi*, *An. strodei* e *An. evansae*. Atribuímos a grande diversidade entre as espécies encontradas no segundo período ao fato de a área ter sofrido desmatamento recentemente, o que poderia ter ocasionado uma eventual modificação na fauna devido às interferências humanas no ambiente (BRANQUINHO et. al 1993, 1996).

Nossos resultados concordaram com os dados obtidos por TADEI et. al (1993), mostrando que criadouros situados em áreas alteradas pelo homem apresentaram uma maior variabilidade de espécies de *Anopheles*. Os autores capturaram somente *A. oswaldoi* e *A. mediopunctatus* em criadouros situados em áreas não alteradas.

O número de casos vem aumentando drasticamente no Estado do Amapá nos últimos dez anos provavelmente devido ao aumento da mobilidade populacional desencadeada após a criação da área de livre comércio nos municípios de Macapá e Santana, em 1991. A partir de então, a região passou a ser um novo pólo de migração na Região Amazônica, o que pode estar ocasionando profundas alterações no meio ambiente. Cabe

às autoridades de saúde do Estado manterem-se em alerta para possíveis mudanças na fauna anofélica e sua associação com os casos de malária.

Nossos resultados apontaram duas espécies importantes na região do rio Matapí, Estado do Amapá: *An. darlingi*, espécie mais capturada ao longo dos meses que totalizou 19.424 exemplares, e *An. albitarsis*, com 5.773 espécimens. Em relação à positividade do *An. darlingi* e do *An. albitarsis* observamos que ambas se infectam com as cinco espécies de *Plasmodium* (vide tabela 18). Sabendo-se que *An. albitarsis* é considerado vetor secundário na transmissão da malária, o nosso objetivo foi validar ao máximo a positividade de tal espécie. Por esta razão, o limiar de reatividade do ELISA foi estabelecido pela média das absorbâncias de 100 mosquitos negativos, acrescida de 3 desvios padrão, procurando-se minimizar o aparecimento de resultados falsos positivos.

Em fevereiro de 1999, foi realizada uma coleta na localidade de Bom Jesus de Fernandes, Município de Tartarugalzinho. *An. braziliensis* foi a espécie mais encontrada, totalizando 99% da coleta (n=347), estando infectado somente pelo *Plasmodium vivax* like (0,8%). Observamos uma diferença marcante entre a localidade acima e São Raimundo do Piratiba. Estes resultados demonstram a importância de conhecer as espécies vetoras e sua densidade no tempo e no espaço.

Durante as nossas capturas, Voorham (comunicação pessoal) procurou anofelinos ao redor dos povoados nas três localidades. Tanto machos quanto fêmeas de *An. darlingi* foram encontrados pousando em vegetação baixa enquanto *An. albitarsis* encontraram-se ao redor e embaixo de palafitas. Nenhuma das espécies foi encontrada dentro das casas. A construção das moradias é feita de tal forma que não existam paredes completas para servir de pouso aos insetos. Foram observadas diferenças no comportamento hematofágico entre as duas espécies de anofelinos. *Anopheles albitarsis* mostrou maior atividade durante as primeiras quatro horas da noite, enquanto *An. darlingi* permaneceu ativo durante toda noite. Nas Américas observa-se grande diversidade na atividade hematofágica

entre as espécies de anofelinos e em membros de uma mesma espécie em relação a sua distribuição geográfica e aos diferentes períodos do ano (ZIMMERMAN 1992; VOORHAM, *in review*).

No trabalho de SEGURA (1998), item 1.6. da Introdução, o autor realizou capturas somente das 19:00 às 21:00 horas, fato que poderia ter comprometido a constatação da real participação do *An. darlingi* na cadeia de transmissão da doença. As nossas coletas foram de 12 horas, pois consideramos que fornecem maior precisão quanto às espécies de anofelinos capturadas nas áreas, nas medidas de antropofilia, no índice de esporozoítas e na taxa de sobrevivência dos mosquitos.

Conforme comentado anteriormente, achamos que apenas dados relacionados com a população humana não demonstram o que realmente está acontecendo na área de transmissão de malária. Devemos sempre que for possível correlacionar os dados soroepidemiológicos com os estudos entomológicos para que não corramos o risco de direcionar nossos estudos e obter dados inconclusivos. Infelizmente não pudemos fazer um estudo entomológico e soroepidemiológico na mesma época, porém os dados obtidos da população, que serão discutidos adiante, poderão auxiliar em futuros estudos destas populações.

Conforme discutido em Mat. e Métodos, sangue de indivíduos das três localidades foram colhidos e submetidos a exames de gota espessa, detecção de anticorpos contra formas assexuadas (IFI), detecção de anticorpos contra peptídeos relacionados com a região repetitiva da CSP das várias espécies e variantes de *plasmódios*.

Neste estudo soroepidemiológico, observamos que grande parte dos indivíduos estudados já haviam tido contato com malária. Esta constatação foi medida por meio do encontro de anticorpos da classe IgG contra as formas sanguíneas de *P. vivax* e *P. falciparum*. A porcentagem de indivíduos com resultados positivos em São Raimundo, São João e Santo Antonio, para *P. vivax*, foram, respectivamente, 80%, 50% e 70,8%. Porcentagens

menores foram observadas para detecção de anticorpos contra *P. falciparum*: 31,4%, 28,6% e 29,1%, respectivamente para as localidades de São Raimundo, São João e Santo Antonio.

Com relação a infecções recentes, isto é, detecção de anticorpos da classe IgM, observamos que houve número igual, de aproximadamente 50%, para ambas as espécies de *plasmódios* nas três localidades estudadas. Estas reações podem originar em resultados cruzados entre as espécies de *plasmódios*, porém, raros resultados positivos foram observados para ambos os *plasmódios*, indicando que talvez a malária por *P. falciparum* esteja aumentando nestas populações.

À primeira vista, surpreendeu-nos o resultado obtido em ELISA, visto que 36,7% da população total (três localidades) apresentaram anticorpos anti *P. malariae*. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre as absorvâncias obtidas nos soros coletados em São Raimundo e em Santo Antonio. Verificamos diferença com relação à soropositividade de *P. malariae* ($p < 0.05$) nos soros coletados em São João. Infelizmente não podemos afirmar se esta população está sendo infectada com *P. malariae* devido ao número baixo de amostras coletadas. Porém acreditamos elucidar melhor esta questão nos futuros estudos que faremos nesta população.

Ao analisarmos o número de casos notificados pela FUNASA em todo o Estado do Amapá nos anos de 1995, 1996, 1997 e 1998, verificamos a presença de um único caso dessa espécie nesse período. Sabemos que o encontro de anticorpos em reações sorológicas é um dos meios indiretos de se analisar o contato do indivíduo com a doença. O ELISA com peptídeos sintéticos, correspondentes à porção repetitiva da proteína circunsporozoíta, é utilizado como um marcador epidemiológico da doença e permite investigar a possibilidade da população manter contato com anofelinos infectados ou não. Entretanto o resultado positivo não indica que o indivíduo tenha desenvolvido obrigatoriamente a doença, pois para tanto é preciso que um determinado número de esporozoítos consiga atingir os hepatócitos.

O encontro de anticorpos contra as formas sangüíneas só nos diz que este indivíduo provavelmente contraiu a doença, porém continuamos sem encontrar o parasita. Entretanto estas informações iniciais são de suma importância em uma avaliação epidemiológica. Sendo assim, o encontro do parasita é o único marcador que nos dá a certeza de que os indivíduos contraíram de fato a doença.

ARRUDA e VOORHAM 1994 (dados não publicados) trabalhando em área de garimpo ao norte do Estado do Mato Grosso demonstraram por meio da análise de lâminas de gota espessa que 30% dos casos reportados pela FUNASA como *P. vivax* foram causados pelo *P. malariae*. CAVASINI et. al 2000, exploraram esta questão ao compararem resultados obtidos na identificação de *Plasmodium* por meio da gota espessa, com a técnica de PCR, em 96 pacientes positivos para malária e residentes em Rondônia. Surpreendentemente, por meio de diagnóstico via PCR, 10% dos pacientes eram positivos para *P. malariae*. Os autores discutem o problema da sub-notificação desta espécie no Brasil e suas implicações no controle da doença.

Provavelmente a ocorrência do *P. malariae* seja sistematicamente sub- notificada devido à:

- Baixa parasitemia nos portadores, visto que os merozoítas desta espécie preferencialmente invadem hemácias maduras (Di SANTI e BOULOS 1999).

- Baixa sensibilidade da gota espessa: em regiões de transmissão instável é necessária a introdução de metodologias mais sensíveis, com limiar de detecção inferior a 100 parasitas/μl de sangue. Uma desvantagem na gota espessa é a perda de parasitas que pode ser de 66% dos trofozoítas e de 80% a 90% de gametócitos. Apesar dessa perda, a gota espessa é cerca de 20 vezes mais sensível que a extensão de sangue, devido à camada de sangue ser 20 a 30 vezes mais densa. Em contrapartida, no esfregaço o *Plasmodium* é visualizado dentro das células, preservando-se a

morfologia do parasita e possibilitando o estabelecimento de uma relação entre o tamanho da hemácia e o parasita. (ÁVILA, 1994).

- Dificuldade na identificação da espécie: A coloração da gota espessa pelo método de Giemsa produz a hemólise das células sangüíneas promovida pela solução de azul de metileno fosfatado, a fim de promover a desglobinização e pré-coloração do material. Esta coloração revela melhor as granulações de Schuffner, de cor avermelhada, nas hemácias com *P.vivax* e *P.ovale*. No *P. malariae* podem estar presentes as granulações de Ziemann, que são menores que as de Schuffner. A hemácia com *P.malariae* não é dilatada. Os trofozoítas apresentam-se em forma de banda, atravessando a hemácia. Entretanto esta forma evolutiva nem sempre é encontrada. Os gametócitos são redondos, repletos de pigmento malárico (Di SANTI e BOULOS 1999).

A qualidade da hemoscopia está na dependência de diversos fatores, dentre eles: a preparação dos diferentes métodos de coloração, controle de qualidade dos reagentes, qualidade do equipamento, experiência e dedicação do microscopista. Uma sugestão para minimizar a ineficiência da notificação do *P. malariae* é efetuar além da gota espessa a extensão de sangue (em uma lâmina separada), quando surgir casos de *P.vivax* duvidosos ou em casos de baixa parasitemia. Este procedimento é tido como realizado em diversas regiões brasileiras, porém observações ao longo dos anos nos mostram que tal prática não é executada.

Em relação ao encontro de anticorpos anti *P.vivax* VK247 e *P.vivax* like, nossos resultados concordam com os obtidos nos estudos soroepidemiológicos de prevalência da malária desenvolvidos no Estado do Pará, Brasil, situado na fronteira sul do Estado do Amapá, por ARRUDA et. al (1989,1996). ARRUDA et. al (in press) também realizou um importante estudo soroepidemiológico em cinco estados da Amazônia, com o objetivo de verificar a disseminação das variantes de *P. vivax*. Os autores examinaram 1081 amostras de soro, gotas espessas e esfregaços sangüíneos da população nativa, migrantes e garimpeiros residentes. Os

resultados demonstraram a presença das variantes de *P. vivax* nos cinco estados trabalhados. Verificou-se que existe uma variação significativa na média geométrica dos títulos de anticorpos anti-esporozoítos nos diferentes estados. Os autores aventam a possibilidade dessa variação na média geométrica dos títulos estar relacionado com o período de ocupação da região, estabilidade da população e a diversidade de vetores.

Diante dos resultados obtidos no ELISA com peptídeos sintéticos, ocorreu-nos a indagação a respeito de eventuais reações cruzadas entre as espécies de *Plasmodium* pesquisadas.

DUARTE em sua tese de Doutorado (comunicação pessoal) vem desenvolvendo uma interessante abordagem epidemiológica em área de influência da Usina Hidrelétrica de Porto Primavera, divisa entre Mato Grosso do Sul e São Paulo. A autora não encontrou reação cruzada nos 216 soros de indivíduos testados usando os mesmos peptídeos que empregamos (0/216). Ao processar soros de 239 macacos da mesma área de estudo, verificou que apenas cinco apresentaram reações cruzadas (2%).

Em trabalho anterior, DUARTE (1998) estudou 51 soros de macacos capturados na Usina Hidrelétrica da Serra da Mesa, Goiás. A autora encontrou apenas quatro soros que apresentaram reações cruzadas entre *P. malariae*/ *P. brasilianum* e *P. vivax* VK 247. No mesmo trabalho, examinados 53 soros de macacos capturados em São Paulo não foram observadas reações cruzadas.

CURADO (1995) fez um relevante estudo sobre as variantes em área de baixa endemicidade em São Paulo. Ao testar soros por ELISA, usando peptídeos sintéticos, encontrou 4,3% para o *P. vivax*, 5,3% para *P. vivax*-like, 7,1% para a variante VK 247 e 3,6% para o *P. malariae*. Na totalidade de sua amostragem (439), que abrangeu áreas do Vale do Ribeira, Baixada Santista e Litoral Norte, apenas quatro soros reagiram cruzadamente com *P. vivax* VK 247 e *P. malariae* (0,9%).

A autora aventa a possibilidade das variantes relacionarem-se às características da malária desta região que, diagnosticada como malária vivax, acomete os pacientes (residentes na região) com sintomatologia bastante atípica. A parasitemia geralmente é baixa e os casos são geralmente oligossintomáticos ou assintomáticos. A malária presente na Serra do Mar evidencia um quadro peculiar de transmissão que talvez envolva reservatórios simianos, atuando como fonte de transmissão na cadeia epidemiológica (CURADO, 1995; CURADO et. al 1997).

Diferentemente dos resultados obtidos em áreas não endêmicas, nossos resultados demonstram haver reação cruzada entre os anticorpos anti CSP dos diversos peptídeos. Em São Raimundo, observamos que 8,6% dos soros reagiram tanto para *P. malariae*, *P. vivax* e *P. vivax* like. Em São João, 21,4% dos soros reagiram com *P. malariae*, *P. vivax* e *P. vivax* VK247, enquanto na localidade de Santo Antonio esta porcentagem foi de 12,5% para *P. malariae*, *P. vivax*, *P. vivax* like e *P. vivax* VK247.

A literatura aponta-nos um estudo realizado por COCHRANE et. al 1990 com soros de índios da Região Amazônica. Foi observado que alguns soros positivos para a variante VK247 também reagiram com esporozoítas e com peptídeo de *P. malariae*/*P. brasilianum*. Feita a absorção, foi observada significativa queda na reatividade dos soros positivos para *P. vivax* VK 247. Anticorpos policlonais e monoclonais de camundongos imunizados com esporozoítas de *P. brasilianum* apresentaram reação cruzada para *P. vivax* VK 247. Estes resultados sugerem que exposições ao *P. brasilianum* ou *P. malariae* podem gerar anticorpos anti-esporozoítas que reagem com *P. vivax* VK247. Não absorvemos os soros positivos para *P. malariae* com *P. vivax*, mas imaginamos que, tal como no trabalho acima, esta porcentagem tende a diminuir.

Nossos resultados mostraram baixa positividade de infecção do *P. malariae* em *An. albitarsis* (4/3523) e *An. darlingi* (4/9450). PÓVOA et al 2001, na Serra do Navio, encontraram elevada positividade do *P. malariae* em anofelinos. Os autores acreditam na manutenção de um ciclo silvestre.

devido à presença de diversos macacos observados nas circunvizinhanças das áreas trabalhadas. Apesar do encontro elevado de mosquitos positivos com *P. malariae*, os autores não acreditam que esta espécie apresente grande significado epidemiológico devido à ausência de notificação de casos no Hospital local e pela FUNASA.

Finalizando, inúmeros fatores cooperam para o terrível panorama mundial atribuído à malária nos últimos anos, dentre eles, a falta de conhecimento sobre as interações das espécies vetoras e do agente etiológico com o meio ambiente, condições estas, que impedem o estabelecimento de um programa de controle capaz de atuar de forma efetiva nas diversas regiões brasileiras. Esperamos que os resultados obtidos neste trabalho, contribuam com as autoridades locais para a implantação de estratégias de controle mais sistematizadas e dirigidas às populações ribeirinhas, não só do Estado do Amapá, como também das populações da Região Amazônica de modo geral.

7. Conclusões

1. A ocorrência de malária verificada por meio do teste da gota espessa, apresentou alta positividade para *P. vivax* e *P. falciparum*. A doença acometeu principalmente crianças menores de 15 anos de idade;

2. Devido ao fato de os dados de notificação de malária da área obtidos por busca passiva mostrarem casos esporádicos por *P. falciparum*, e nossos resultados pela busca ativa apresentar 50% desta espécie, aventamos duas hipóteses:

- Possivelmente estes dados refletiram negativamente sobre a precisão da notificação da malária neste Estado.

- Provavelmente a malária por *P. falciparum* esteja aumentando nestas populações;

3. A prevalência total do teste de Imunofluorescência Indireta com antígeno de *P. falciparum* da classe IgG foi 30,1% e da classe IgM foi 16,4%. Para *P. vivax* a classe IgG apresentou 71,2% de positividade enquanto para IgM foi 15,0%;

4. Anticorpos anti-esporozoítas do *P. vivax* foi o predominante na região (38,4%), seguido do *P. malariae* (36,7%), *P. falciparum* (26,0%), *P. vivax* VK 247 (20,5%) e *P. vivax* like (17,8%);

5. Devido à alta prevalência de anticorpos anti-CSP de *P. malariae* e a presença de vetores positivos para esta espécie, sugerimos que a notificação do *P. malariae* seja sistematicamente sub- notificada nesta região;

6. A presença do *An. albitarsis* foi mais pronunciada na época de chuva enquanto que *An. darlingi* no período de seca. Estes resultados merecem estudos posteriores.

7. *An. darlingi* e *An. albitarsis* são suscetíveis a infecção pelo *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.vivax* VK247, *P.vivax* like e *P.malariae*;

8. Referências Bibliográficas

- [Anonymus] **Amabusca**. [on line]. [snt] Disponível em [URL:http://www.amapabusca.com.br](http://www.amapabusca.com.br) [2001 mar 5].
- [Anonymus] **Amapage**. [on line]. Disponível em [URL:http://www.Brasil.terravista.pt/claridade/3316](http://www.Brasil.terravista.pt/claridade/3316). [2000 dez 30] [2001 fev 2] [2001 mar 3].
- Andrade L de, Martelli CM, Oliveira RM, Arias JR, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. **Clin Infect Dis** 1995; 20: 475.
- Antuñano FL. Situação dos programas de erradicação da malária nas Américas. XX informe. **Supl. Rev Brasil. Malariol. D. Trop.** 1985; 37:31-7.
- Arnot DE, Barnwell J W, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Circumsporozoite protein of *P. vivax* gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science** 1985; 30: 815-8.
- Arruda ME, Aragaki C, Gagliardi F, Haile RW. A seroprevalence and descriptive epidemiological study of malaria among Indian tribes of the Amazon basin of Brazil. **Ann Trop Med Parasitol** 1996; 90:135-143.
- Arruda ME, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Maracic M, Ferreira AW, Cochrane AH. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *P. falciparum* and *P. vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. **Amer J Trop Med Hyg** 1986; 35 (5): 873- 881.
- Arruda ME, Dutra L, Martins J, Zimmerman RH. *in review*. Widespread distribution of *P. vivax* variants VK247 and *vivax-like* human malaria in the Amazon region of Brazil.
- Arruda ME, Nardin EH, Nussenzweig RS, Cochrane AH. Sero epidemiological studies of malaria in Indian tribes and monkeys of the Amazon basin of Brazil. **Amer J Trop Med Hyg** 1989; 41 (4): 379-385.
- Arruda ME, Souza RC, Veiga ME, Ferreira AF, Zimmerman RH. Prevalence of *P. vivax* variants VK247 and *P. vivax-like* human

- malaria: a retrospective study in Indian populations of the Amazon region of Brazil. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 1998; 92: 628.
- Ávila SLM. **Avaliação do desempenho de métodos de laboratório no diagnóstico da malária humana; sugestões para normatização.** São Paulo; 1994. [Tese de doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas da USP].
- Barr PJ, Gibson HL, Enea V, Arnot DE, Hollingdale R, Nussenzweig V. Expression in yeast of a *P. vivax* antigen of potential use in human malaria vaccine. **J. Exp. Med** 1987; 165: 1160-71.
- Beier JC, Oster CN, Onyango FK, Bales JD, Sherwood JA, Perkins PV, Chumo DK, Koech DV, Whitmire RE, Roberts CR, Diggs CL, Hoffman SL. *Plasmodium falciparum* incidence relative to entomologic inoculation rates at a site proposed for testing malaria vaccines in western Kenya. **Amer J Trop Med Hyg** 1994; 50: 529-536.
- Bhatt RM, Sharma RC, Kohli VK, Gautam AS, Gupta DK. Biting rhythms of malaria vector *An. culicifacies* in Kheda district, Gujarat. **Indian J Malariol** 1991; 28: 91-97.
- Birley MH, Charlwood JD. The effect of moonlight and other factors on the oviposition cycle of malaria vectors in Madang, Papua New Guinea. **Ann Trop Med Parasitol** 1989; 83: 415-22.
- Bouma MJ, Dye C. Cycles of malaria associated with El Nino in Venezuela. **JAMA** 1997; 278 (21): 1772-4.
- Branquinho MS, Araujo MS, Natal D, Marrelli MT, Rocha RM, Taveira FA, Klotzel J. *Anopheles oswaldoi* a potential malaria vector in Acre, Brazil. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 1996; 90: 233.
- Branquinho MS, Lagos CB, Rocha RM, Natal D, Barata JM, Cochrane AH, Nardin E, Nussenzweig RS, Kloetzel J. Anophelines in the state of Acre, Brazil, infected with *P. falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae*. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 1993; 87: 391-394.
- Branquinho MS, Marrelli MT, Curado I, Natal D, Barata JMS, Tubaki R, Carreri-Bruno GC, Menezes RT & Kloetzel J. Infecção de *An.*

- (*Kerteszia*) *cruzei* por *P. vivax* e *P. vivax* variante VK247 nos Municípios de São Vicente e Juquitiba, São Paulo. **Pan. Am. J. Public Health** 1997; 2(3): 189-193.
- Branquinho MS. Estudo dos potenciais vetores de malária no Acre, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo** 1997. 39 (1): 61-63.
- Bruce-Chwatt LJ. **Essential Malariology**, 2nd. London: William Heinemann Medical Books.Ltd; 1985.
- Bruce-Chwatt LJ. Man against malaria, conquest or defeat. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1979; 73: 605-17.
- Burkot TR, Graves PM. **The value of vector-based estimates of malaria transmission**. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89:125-134.
- Butker D, Maurice J, O'Brien C. Time to put malaria control on the global agenda. **Nature** 1997; 386: 535-536.
- Camargo EP, Alves F, Pereira da Silva L. Symptomless *P. vivax* infections in native Amazonians. **The Lancet** 1999; 353:9162.
- Camargo LM, Ferreira UM, Krieger H, Camargo EP, Pereira da Silva LH. Unstable hypoendemic malaria in Rondônia (Western Amazon Region, Brazil): Epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. **Amer Journal of Trop Med and Hyg** 1994; 51: 16-26.
- Camargo LM, Noronha E, Salcedo JM, Dutra AP, Krieger H, Pereira da Silva LH, Camargo EP. The epidemiology of malaria in Rondonia (Western Amazon region Brazil): study of a riverine population. **Acta Trop Jan 15** 1999; 72 (1): 1-11.
- Capibaribe J. **A saúde no Amapá**. [on line]. Disponível em <http://www.uol.com.br/saude.ap.gov.br/>. [2001 abr 11]
- Castilla RE, Sawyer D. Malaria rates and fate: a socioeconomic study of malaria in Brazil. **Soc. Sci. Med** 1993; 37:1137-1145.
- Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is *P. malariae* in Rondônia, Western Brazilian Amazon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop** 2000; 33 (5): 489-492.

- Cerqueira NL. Distribuição geográfica dos mosquitos da Amazônia. **Revista Brasileira de Entomologia** 1961; 10:111-168.
- Charlwood JD, Paru R, Dagoro H. Lagog Influence of moonlight and gonotrophic age on biting activity of *An. farauti* (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. **J. Med Entomol** 1986; 23: 132-135.
- Cochrane AH, Collins WE, Nussenzweig RS. Monoclonal antibody identifies circumsporozoite protein of *P. malariae* and detects a common epitope on *P. brasilianum* sporozoites. **Infec. Immun** 1992; 45: 592-5.
- Cochrane AH, Nardin EH, Arruda M, Maracic M, Clavijo P, Collins WE, Nussenzweig RS. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of *P. vivax*. **Am. J. Trop.Med. Hyg** 1990; 43: 446-5.
- Colauto EM, Barraviera B, Meira DA, Matsubara LS, Pellegrino J, Machado PE, Sogayar R, Barboza AF, Silva EA, Colauto R, Pirolla JÁ, Mendes RP. Malaria in the municipality of Humaitá, State of Amazonas. XII. Incidence of erythrocyte resistance factors in the general population and in patients: hemoglobin S and Duffy blood system. **Ver. Instit. Med. Trop. São Paulo** 1981; 23 (Supl. 5): 72-78.
- Collins FH, Besansky NJ. Vector Biology and the Control of Malaria in Africa. **Science**, 1994; 264: 1874-1875.
- Consoli RA, Oliveira RL. Classificação e Principais Espécies de importância Sanitária In: **Principais Mosquitos de Importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro, FIOCRUZ :17-92; 1994.
- Constantine C, Li SL, Torre AD, Sagnon NF, Coluzzi M, Talor CE. Density, survival and dispersal of *An. gambiae* complex mosquitoes in a West African Sudan savanna village. **Med Vet Entomol** 1996; 10: 203-219.
- Curado I, Duarte AMR, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti-bloodstream and circumsporozoite antigens (*P. vivax* and *P. malariae/P.brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1997; 92: 235-43.

- Curado I. **Soroepidemiologia de malária em áreas de baixa endemicidade no Estado de São Paulo**. São Paulo; 1995. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- David ZG. **Moustiques Anthrophiles de la Vilee D'Abidjan. Faculté des Sciences et Techiques de L'université Nationale de Cote-D'ivoire (Abdijan)**; 1991. [Tese de Doutorado]
- Deane LM, Causey OR, Deane MP. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. **Rev. Ser. Esp. Saúde Pub** 1948; 4: 827-965.
- Deane LM. A cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia Brasileira. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1989; 84 (Supl IV): 149-156.
- Deane LM. Malaria vectors in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1986; 81 (suppl. II): 5-14. Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg** 1988; 38: 223-30.
- Deane LM. Os grandes marcos na história do controle da malária. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 1992; 25: 12-22.
- Di Santi SM, Boulos M. Protozoários-Malária In: Cimmerman B, Cimmerman S. **Parasitologia Humana e seus fundamentos**. 1ª ed. São Paulo: ed. Atheneu; 1999. p.139-156.
- Donald G, McNeil Jr. Preços dos medicamentos em alta em países africanos **The New York Times**. Nova Iorque, 2000 jun 17.
- Duarte AMCD. **Estudo de Malária em Macacos Silvestres Brasileiros**. São Paulo, 1998 . [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da USP].
- Dutra AP. Informações sobre Malária. [on line]. snt. Disponível em [URL:http://www.sucen.gov.br](http://www.sucen.gov.br) [2001 out 30].
- Elissa N, Karch S, Bureau P, Ollomo B, Lawoko M, Yangari BE, Georges J. Malaria Transmission in Region of Savanna-forest Mosaic, Haut-

- Ogoouê, Gabon. **Journal of the American Mosquito Control Association** 1999; 15(1): 15-23.
- Faran ME, Linthicum KJA. **Handbook of the Amazonian species of An. (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae). Mosquito System** 1981; 13: 1 81.
- Ferreira AW, Sanches MCA. Malária humana: padronização e otimização de testes sorológicos para diagnóstico individual e inquéritos soropidemiológicos. **Rev. Inst. Med. Trop.** 1988; 30: 137-46.
- Fontenille D, Lepers JP, Coluzzi M, Campbell GH, Rakotoarivony I, Coulanges P. Malaria transmission and vector biology on Sainte Marie Island, Madagascar. **J Med Entomol** 1992; 29: 197-202.
- Forattini OP, Gomes AC, Natal D, Kakitani I, Marucci D. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Rev.Saúde Publ** 1987; 21:171-187.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. Breeding of *An. albitalarsis* in flooded rice fields in South-Eastern Brazil. **Rev. Saúde Pública** 1994; 28:329-31.
- Fundação IBGE. **Contagem da População Brasileira- 1996**. Rio de Janeiro; 1997. v. 1 e 2.
- Fundação IBGE. **Dados demográficos**. Rio de Janeiro; 2000.
- Fundação Nacional da Saúde. **Boletim epidemiológico parcial de malária referentes a 1999**. [Informe técnico, Gerência Técnica de Malária; 1999]. Ministério da Saúde. Brasília, Ano 1:4; 1999.
- Fundação Nacional da Saúde. **Departamento de Operações, Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por vetores. Controle de Malária: Diretrizes Técnicas**. Brasília: Ministério da Saúde; 1995.
- Fundação Nacional da Saúde. **Ministério da Saúde/ FUNASA –CENEPI, SES/ SINAN**. Brasília, 2001.

Fundação Nacional da Saúde. **Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal**; 2000 (Ministério da Saúde/FUNASA).

Garrett-Jones C. Prognosis for the interpretation of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity. **Nature** 1964; 204: 1173-1175

Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Nettel JC, Villarreal C, Kain KC, Hernandez JE. Differential susceptibilities of *An. albimanus* and *An. pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *P. vivax* variants VK210 and VK247 in southern Mexico. **Infect immunity** 1999; 67: 410-412.

Governo do Estado do Amapá. **Subsídios para o zoneamento econômico- ecológico do Amapá. Uma análise das Unidades de Conservação Biológica**. Série Técnica Macapá, AP, Julho; 1993

Governo do Estado do Amapá. Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá, **Programa de Zoneamento Ecológico Econômico- Zee**; 1996. (IEPA).

Governo do Estado do Amapá. **Números de caso das doenças de notificação compulsória por trimestre e coeficiente de incidência**. Amapá; 1999. [Secretaria da Saúde/UVE/DE/ CVS/SESA-AP].

Governo do Estado do Amapá. [on line] Disponível em < URL: <http://www.amapa.gov.br/biodiversidade/principal.htm> > [2000 dez 3].

Governo do Estado do Amapá. [on line]. Disponível em < URL: [http://www. Amapá.história.htm](http://www.Amapá.história.htm) > [2001 fev 2].

Governo do Estado do Amapá. [on line]. Disponível em < URL: <http://www.Mre.gov.br/> > [2001 mar 15].

Governo do Estado do Amapá. [on line]. Disponível em < URL: <http://www. economia.gov.br/> > [2001 mar 6].

Governo do Estado do Amapá. [on line]. Disponível em < URL: <http://www.amapa.gov.br/amapa21.htm> > [2001 mar 03]

Governo do Estado do Amapá. [on line]. Disponível em < URL: <http://www.ap.gov.br/acoese projetos/pdsa.html> > [2001 mar 26].

- Greenwood BM & Armstrong JRM. Comparison of two simple methods for determination malaria parasite density. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg** 1991; 85:186-8.
- Guimarães JH. **Systematic Database of Diptera of the Americas South of the United States (Family Culicidae)**. São Paulo; 1997. Plêiade/Fapesp, 286p.
- Hay SI, Rogers DJ, Toomer JF, Snow RW. Annual *P. falciparum* entomological inoculation rates (EIR) across Africa: literature survey, internet access and review. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg** 2000; 94: 13-127.
- Hayes J, Calderón G, Falcón R, Zambrano V. Newly incremented anopheline vectors of human malaria parasites in Junin department, Peru. **J Amer Mosq Control Assoc** 1987; 33: 418-422.
- Herrera S, Suarez MF Sanchez GI, Quinones ML, Herrera M.. Uso de la tecnica inmuno-radiometrica (IRMA) em Anophelinos. de Colombia para la identificacion de esporozoitos de *Plamodium*. **Col Med** 1987; 18: 2-6.
- Kain KC, Keytone J, Franke ED, Lanar DE. Global distribution of a variant of the circumsporozoite gene of *P. vivax*. **The Journal of Infectious Diseases** 1991; 164: 208-210.
- Kain KC, Brown AE, Webster HK, Wirtz RA, Keystone JS, Rodriguez MH, Kinahan J, Rowland M, Lanar DE. Circumsporozoite genotyping of global isolates of *P. vivax* from dried blood specimens. **J Clin Microbiol** 1992; 30:1863-1866.
- Klein TA, Lima JBP, Tang AJ. Biting behavior of An. mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop** 1991; 24: 13-20.
- Klein TA, Lima JBP. Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles*. mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. **J. Am. Mosq. Cont. Assoc.** 1990; 6: 700-7.

- Klein TA, Lima JBP, Tada MS. Comparative susceptibility of *Anopheles* mosquitoes to *P. falciparum* in Rondonia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg** 1991a; 44: 598-603.
- Klein TA, Tada MS, Lima JBP. Comparative susceptibility of *Anopheles* mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *P. vivax*. **Am. J. Trop. Med. Hyg** 1991b; 45: 463-70.
- Knell AJ. **Malária**. Oxford Univ. Press; 1991
- Kremsner PG, Neifer S, Zotter GM, Bienzle U, Rocha RM, Maracic M, Clavijo P, Nussenzweig RS, Cochrane A H. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite proteins of human malaria parasites including a variant of *P. vivax*, in the population of two epidemiologically distinct areas in the state of Acre, Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg** 1992; 86: 23-7.
- Lal A, De La Cruz VF, Collins WE, Campell GH, Procell PM, McCutchan TF. Circumsporozoite protein gene from *P. brasilianum*. Animal reservoirs for human malaria parasites? **J. Biol. Chem** 1998a; 263:5495-98.
- Lindblade KA, Walker ED, Onapa AW, Katungu J, Wilson ML. Highland malaria in Uganda: prospective analysis of epidemic associated with El Niño. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 1999; 93: 480-487.
- Lounibos LP, Conn JE. Malaria vector heterogeneity in South America. **Amer Entomol** 2000; 46: 238-249.
- Lourenço- de- Oliveira R, Guimarães AG, Arlé M, Silva TF, Castro MG, Motta MA, Deane LM. *Anopheles* species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia state, Amazon region of Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1989; 84: 501-514.
- Loyola EG, Gonzalez CL, Rodríguez MH, Arredondo Jimenez JI, Bennett S, Bown DN. *An. albimanus* (Diptera: Culicidae) host selection patterns in three ecological areas of the coastal plains of Chiapas, southern Mexico. **J. Med. Entomol** 1993; 30: 518-523.
- Macdonald G. The epidemiology and control of malaria. Oxford Press, 1957.

- Machado Filho MR. **Estudo epidemiológico da malária urbana de Porto Velho- Rondonia, no período de julho de 1992 a junho de 1997.** [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP]; 1999.
- Machado RLD, Póvoa MM. Distribution of *P. vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax-like*) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg** 2000; 94: 377-81.
- Machado RLD. **Distribuição das variantes de *P. vivax* (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) em três áreas endêmicas da Região Amazônica Brasileira, utilizando a amplificação do gene codificador da proteína que circunda o esporozoito (CSP).** [Dissertação de Mestrado - UFPA]; 1997.
- Marques AC. Situação da malária no Brasil, **Relatório da Gerência Técnica de Malária**, (Fundação Nacional da Saúde). Brasília; 1980.
- Marques AC. Migrations and the dissemination of malaria in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1986; 81: 17-30.
- Marques AC. Human migration and the spread of malaria in Brazil. **Parasitology Today** 1987; 3: 166-70.
- Marques AC. Situação atual do controle da malária no Brasil, **Relatório da Gerência Técnica de Malária**. [Fundação Nacional da Saúde]. Brasília; 1993.
- Marques AC, Gutierrez HC. Combate à malária no Brasil: evolução situação atual e perspectivas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop** 1994; 27: 91-108.
- Marrelli MT, Branquinho MS, Lagos CB, Natal D, Kloetzel J. Correlation between positive serology for *P. vivax*, *like/P. simiovale* malaria parasite in the human and anopheline populations in the State of Acre, Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg** 1998; 92: 149-151.
- Martins E, Capobianco JP, Xavier R, Ventura Z. .In: **Amapá: um norte para o Brasil** organizador Nilson Moulin. São Paulo: ed. Cortez; 2000.

- McGrevy P, Dietze R, Prata AE, Hembree SC. Effects of immigration on the prevalence of malaria in rural areas of the Amazon Basin of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1989; 84: 485-91.
- Mendis C, Herath PR, Rajakaruna J, Weerasinghe S, Gamage-Mendis AC, Mendis KN, De Zoysa AP. Method to estimate relative transmission efficiencies of *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) in human malaria transmission. **J. Med. Entomol** 1992; 29: 188-196.
- Ministério da Saúde. **Informe epidemiológico da SUS/CENEPI**. 1(17), Brasil; 1992.
- Ministério da Saúde - Fundação Nacional da Saúde. **Casos de malária no Brasil**. DATASUS [on line], 2000
- Molineaux L. Entomological parameters in the epidemiology and control of vector-borne diseases. In: **Medical Entomology Centenary. Sym Proc Roy Soc Trop Med Hyg** 100-105, 1978.
- Nardin EH, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Harinasuta KT, Collins WE, Tapchaisri P, Chomcham Y. Circumsporozoite (CS) proteins of human malaria parasites *P. falciparum* and *P. vivax*. **J. Exp. Med.** 1982; 156:20.
- Noguer A, Wernsdorfer WH, Kouznetsov R, Hempel J. The malaria situation en 1976. **WHO Chron** 1978; 32:9-17.
- Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. **Cell** 1985; 42:401.
- Oliveira-Ferreira J de, Oliveira RL de, Teva A, Deane LM, Ribeiro CDT. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia state, Brazilian Amazon. **Amer J. Trop. Med. Hyg.** 1990; 43: 6-10.
- Oliveira DA, Holloway BP, Durigon E L, Collins WE, Lal AA. Polymerase chain reaction and a liquid-phase, nonisotopic hybridization for species-specific and sensitive detection of malaria infection. **Am.J.Trop. Med. Hyg.** 1995; 52: 139-44.
- Ozaki LS, Gwadz RW, Godson GN. Simple centrifugation method for rapid separation of sporozoites from mosquitoes. **J. Parasitol.** 1984; 70: 831-3.

- Panamerican Health Organization. **Status of malaria in the Americas.** PAHO/HCP/HCT/98; 1998. (PAHO)
- Passos AD, Fialho RR. Malária: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 1998; 31 (suppl. 2): 93-105.
- Phillipson JD. New drugs from nature – It could be new. **Phytotherapy Research**, 1999; 13: 2-8.
- Póvoa MM, Segura N, Lacerda R, Silva OV da, Almeida RN, Lesse R, Rosário V, Milesma WDC. *Anophelines* infected with human *P.* in the Serra do Navio region of Amapá State, Brazil. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 1993; 87:381.
- Qari SH, Goldman TF, Povia MM, Di Santi S, Alpers MP, Lal A. Polymorphism in the circumsporozoite protein of the human malaria parasite *P. vivax*. **Mol. Bioch. Parasitol.** 1992; 55: 105-14.
- Qari SH, Shi Y, Goldman TF, Udhayakumar V, Alpers MP, Collins E, Lal A. Identification of *P. vivax* like human malaria parasite. **The Lancet** 1993; 341: 780-3.
- Rey L. Os Plasmódios e a Malária: I. Malária . **Parasitologia**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p.286-97.
- Rocha J e Mascarenhas B. M. Observações sobre a atividade diária de mosquitos (Díptera: Culicidae) nos arredores de Belém, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia** 1994; 10(2): 225-233.
- Rocha JAM. **Os mosquitos (Diptera: Culicidae) da estação Científica Ferreira Penns- ECFPn, Caxiunã, Melgaço, Pará, Brasil: Ataque, Sazonalidade e Estatificação Arbórea.** [Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Pará & Museu Emílio Goeldi] Belém; 1996.
- Rodriguez MH, Bown DN, Arredondo-Jimenez JI, Villarreal C, Loyola EG, Frederickson CE. Gonotrophic cycle and survivorship of *An. albimanus* (Diptera: Culicidae) in southern Mexico. **J. Med. Entomol** 1992; 29: 395-399.
- Rodriguez MH, Gonzalez-Ceron L, Hernandez JE, Nettel JA, Villarreal C, Kain KC, Wirtz RA. Different prevalences of *P. vivax* phenotypes

- VK210 and VK247 associated with the distribution of *An. albimanus* and *An. pseudopunctipennis* in Mexico. **Am J. Trop. Med. Hyg.** 2000; 62: 122-7.
- Rosa-Freitas MG, Deane LM, Momen H. A morphological, isoenzymatic and behavioral study of ten populations of *An. (Nyssorhynchus) albitarsis* Lynch-Arribalzaga, 1878 (Diptera: Culicidae) including from the type-locality-Baradero, Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1990; 85:275-89.
- Rosa-Freitas MG, Oliveira RL de, Carvalho-Pinto CJ de, Flores-Mendoza C, Fernandes TSN. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1998; 93: 651-655.
- Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, Waters AP, Prasittisuk C. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *P. vivax*. **Science** 1989; 245:973-6.
- Rotraut AGBC, Oliveira RL. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. **FIOCRUZ** 1994; 228.
- Rubio-Palis Y, Curtis CF, Gonzáles C, Wirtz R A. Host choice of anopheline mosquitoes in a malaria endemic area of western Venezuela. **Med. Vet. Entomol** 1994b; 8: 275-280.
- Rubio-Palis Y, Curtis CF. Biting and resting behaviour of anophelines in western Venezuela and implications for control of malaria transmission. **Med. Vet. Entomol** 1992b; 6: 325-334.
- Rubio-Palis Y, Wirtz RA, Curtis CF. Malaria entomological inoculation rates in western Venezuela. **Acta Trop** 1992c; 52: 167-174.
- Rubio-Palis Y. Influence of moonlight on light trap catches of the malaria vector *An. nuneztovari* in Venezuela. **J. Ame. Mosq. Control .Assoc.** 1992a; 8: 178-180.
- Rubio-Palis Y. Variation of the vectorial capacity of some anophelines in western Venezuela. **Am J. Trop. Med. Hyg.** 1994a; 50:420-244.
- Salcedo JMV, Camargo EP, Krieger H, Pereira da Siva LH, Camargo LM. Malaria Control in an Agro-Industrial Settlement of Rondonia

- (Western Amazon Region, Brazil). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** Mar./Apr.2000; Rio de Janeiro. v.95:2
- Santos FR. In: **História do Amapá**. Quarta edição, Macapá-AP/ Ed.Valcan, 1998.
- Santos RlaC. **Medida da Capacidade Vetorial de *An. albitarsis* e de *An. (Kerteszia)* no Vale do Ribeira**, São Paulo, [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da USP]; 2001.
- Sawyer D. Economic and social consequences of malaria in new colonization projects in Brazil. **Soc Sci Med** 1993;37: 1131-1136.
- Sawyer D. In: **Fronteir malaria in the Amazon Region of Brazil: types of malaria situations and some implications for control**. (mimeografiado), Brasília, 1988.
- Sawyer D. Malaria on the Amazon fronteir: economic and social aspects of transmission and control. CEDEPLAR/NFMG. Belo Horizonte, **Relatório de pesquisa**, Belo Horizonte; 1987.
- Sawyer D. The potential contribution of social research to control of malaria in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1986; 81: 31-7.
- Segura MNO. **Estudo do *An. (Nys) darlingi* Root, 1926 e *An. (Nys) albitarsis* Arribalzaga, 1878 (Diptera: Culicidae) como vetores de malária numa mesma área de transmissão, e caracterização de espécies do complexo albitarsis**. Belém; 1998. [Dissertação de mestrado - UFPA].
- Service M. W. Mosquito Ecology: Field Sampling Methods, 2nd ed. **Elsevier Appl Sci Pub** 1993. [snt]. London.
- Snounou G, Pinheiro L, Gonçalves A, Fonseca L, Dias F, Brown KN, 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.
- Souza C. Malária no Brasil: necessidade em ciência e tecnologia. **Rev. Brasil. Malariol. D.Trop** 1985; 37: 157-64.

Spielman A, Kitron U, Pollack RJ. Time limitation and the role of research in the worldwide attempt to eradicate malaria. **J. Med. Entomol** 1993; 30: 6-19.

Sucupira IMC, Lacerada RL, Galiza D, Lessa RT, Santa Rosa E, Póvoa MM, Segura MN. Entomofauna e taxa de mosquitos anofelinos do município de São Caetano de Odiveras/ Pará, no período de janeiro de 1998 a setembro de 2000. *Jornal Brasileiro de Patologia* 2001; 37(suppl n4) [XV Congresso Latino Americano de Parasitologia].

SUDAM. **Atlas Climatológico da Amazônia Brasileira**. Ministério do Interior, Belém, Projeto de hidrografia e climatologia da Amazônia. Belém; 1984 [snt].

Tadei WP, Costa WLS; Correia JM. Estratificação de populações de *Anopheles* para preferências alimentares. **Ciê. e Cult.** 1986; 38: 891.

Tadei WP, Mendes dos Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB. Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de *An.* (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia brasileira. In: Ferreira EGM, Leão ELM e Oliveira LA., editores. **Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia**. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus; 1993. v.2.

Tadei WP. & Santos JBMF. Comportamento de populações de *Anopheles* na hematofagia. **Ciê. e Cult.** 1987; 39: 735.

Tadei WP, Dutary TB. , Santos JMM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **Am. Trop. Med. Hyg.** 1998; 59: 325-335.

Tadei WP. Biologia de anofelinos amazônicos. XI. Estudos em populações de *Anopheles* e controle da malária em Ariquemes (Rondônia). **Acta Amazonica** 1987a; 16/17(único): 151-167.

Tadei WP, Santos JMM, Costa WLS & Scarpassa VM. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles* na dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de

- Ariquemes (Rondônia). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 1988; 30:221-251.
- Tassanakajon A, Boosaeng V, Wilainat P, Panyim S. Polymerase chain reaction detection of *P. falciparum* in mosquitoes. **Trans. Roy.Soc. Trop. Med. Hyg** 1993; 87: 273-5.
- Tauil PL. Comments on the epidemiology and control of malaria in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1986; 81: 39-41.
- Tauil PL. Malária: Agrava-se o quadro da doença no Brasil. **Ciência Hoje** 1984; 2:58-64.
- Tubaki RM. Biting activity of *An. (Kerteszia) cruzii* (Culicidae) in domiciliar habitats in the Southern Atlantic Forest Peruibe of São Paulo, Brasil, **Rev.Bras Entomol.** 1993; 37: 559-575.
- Venkatachalam U, Qari S, Patterson P, Collins W Lal. Monoclonal antibodies to the circumsporozoite protein repeats of a *P. vivax*- Like human malaria parasite and *P. simiovale*. **Infection and Immunity** 1994; 62: 2098-2100.
- Voorham J, (in review). Intra-populacional plasticity in the biting activity patterns of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) in Amapá State, Brazil.
- Voorham J. Os N van, Kaay HJ van der. Reappearance of *P. malariae* in Suriname? **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, 87: 243-244, 1993.
- Wernsdorfer WH. General Introduction: TDR activities im malaria research In: Maurice J, Pearcr AM. (Ed.) **Tropical Disease Research a global partnership** 1987; Geneva: Atar. c.2:22-4.
- Wernsdorfer WH. The importance of malaria in the world. In: Kreier JP. **Malaria**. London: Academic Press.; 1980. p 1-93. v.2
- 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 *An. (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. **J Med Entomol** 1995; 2: 697-704.

- Wirtz RA, Burkot TR, Graves PM, Andre RG. Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *P. falciparum* and *P. vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. **J. Med Entomol** 1987; 24: 433-437.
- Wirtz RA, Sattabongkot J, Hall T, Burkot TR, Rosenberg R. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for *P. vivax*-VK247 sporozoites. **J. Med. Entomol** 1992; 29: 854-857.
- World Health Organization **Division of Control of Tropical Diseases. Malaria: Important Dates.** Disponível em [URL:http://www.WHO.ch](http://www.WHO.ch) [1995] (WHO – on line).
- World Health Organization World malaria situation in 1993. **Weekly Epidemiol Rec**; 1996b. 71(4):25-32. (WHO).
- World Health Organization. Expert Committee on Malaria. **Who Tech Rep Ser** ; 2000. (WHO - Twentieth Report, 892).
- World Health Organization. Ministerial conference on malaria. **Weekly Epidemiol. Rec**; 1992. 67:349-350. (WHO).
- World Health Organization. **Procedimentos Laboratoriais em Parasitologia Médica.** 2^a ed. Livraria Santos; 1999. (WHO).
- World Health Organization. World malaria situation in 1993. **Weekly Epidemiol Rec** ; 1996a. 71(3):17-24. (WHO)
- World Health Organization. World malaria situation in 1993. **Weekly Epidemiol Rec**; 1996c. 71(5):33-40. (WHO).
- Zavala F, Tam JP, Masuda A. Syntethetic peptides as antigens for the detection of humoral immunity to Plasmodium falciparum sporozoites. **J. Immunol. Meth** 1986; 93: 55-61.
- Zimmerman RH, Berti J. The importance of integrated control of malaria for the preservation of wetlands in Latin America. In: **Global Wetlands, Old and New.** New York (NY): ed. W.J. Mitsch. Elsevier Press; 1994. p. 530.
- Zimmerman RH, Voorham J. The use of impregnated bed nets and other materials for the control of malaria in the Americas. **Pan Amer J Public Health** 1997; 2: 18-25.

Zimmerman RH. Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz** 1992; 87 (3): 371-83.

ANEXO 1

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE MALÁRIA

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

NOME: _____

SEXO: 1 MASCULINO 2 FEMININO

GRAVIDEZ : 1 SIM 2 NÃO 3 NÃO SE APLICA

IDADE: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____ MUNICÍPIO: _____ ESTADO: _____

II – INFORMAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS

SINTOMAS:

1 FEBRE

2 NÁUSEAS

3 VÔMITO

4 SUDORESE

5 DIARRÉIA

6 CALAFRIO

7 DOR LOMBAR

8 DOR NA NUCA

9 DOR DE CABEÇA

10 DOR MUSCULAR

11 DOR ARTICULAR

12 DOR ABDOMINAL

13 FALTA DE APETITE

14 MAL ESTAR

15 OUTROS

16 ASSINTOMÁTICO

17 SEM RESPOSTA

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: ____/____/____

DATA DA COLETA: ____/____/____

DATA DO EXAME: ____/____/____

ESPÉCIE DE PLASMÓDIO

1) *P.vivax*

2) *P.falciparum*

3) *P. malariae*

4) *P.ovale*

5) associado

DENSIDADE

1) +/2

2) +

3) ++

4) +++

5) NÃO SE APLICA

DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO: ____/____/____

MEDICAÇÃO UTILIZADA

1 CLOROQUINA

2 AMODIAQUINA

3 PRIMAQUINA

4 SULFATO DE QUININO

5 CLORIDRATO DE QUININO

6 TETRACICLINA

7 CLINDAMICINA

8 DOXICICLINA

9 MEFLOQUINA

10 SEM RESPOSTA

11 OUTROS ANTIMALÁRICOS: _____

III- INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

Número de malárias anterior?

Espécie de Plasmódio:

1. *P.vivax*

2. *P.falciparum*

3. *P.malariae*

4. *P.ovale*

5. Associada (*P.vivax* + *P.falciparum*)

6. Não sabe

7. Não teve

Há quanto tempo? _____ Meses

Nº de Malárias anteriores: _____

Medidas profiláticas utilizadas durante o período de exposição:

1)Sim

2)Não

Quais?

Recebeu transfusão de sangue nos últimos 6 meses ?

1. Sim

2. Não

Onde?

Data: ____/____/____

Onde? _____

DATA: ____/____/____

Doou Sangue nos últimos 6 meses ?

1. Sim

2. Não

Onde? _____

Data: ____/____/____

É usuário de drogas injetável?

1 Sim

2 Não

Ocupação: _____

Local provável de infecção:

Localidade: _____

Informações adicionais:

1. Atividades de lazer:

2. Atividades dentro da mata:

3. Viagens para outras localidades:

4. Você sabe o que é malária?

5. Você sabe os sintomas da malária?

6. Onde você é atendido quando fica doente?

Investigador:

Data:

Local:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-COEP

Av. Dr. Arnaldo, 715 - sala 18 - sub-solo - Cerqueira César
São Paulo-SP CEP: 01246-904
Telefone (0XX11) 3066-7776 - e-mail: mdgracas@usp.br

Of. COEP/073/99

12 de maio de 2000

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo-COEP, analisou e aprovou, em sua 2ª/99 Sessão Ordinária, de 18.04.2000, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96, o protocolo de Pesquisa n.º 283, intitulado: "ESTUDO DA OCORRÊNCIA DA MALÁRIA NO ESTADO DO AMAPÁ", apresentado pela pesquisadora Maria Stela Branquinho.

Atenciosamente,

Paulo Antonio de Carvalho Fortes
Professor Doutor
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da FSP-COEP

Certa vez um soldado disse ao seu tenente:

***Meu amigo não voltou do campo de batalha, senhor, solicito
permissão para ir a buscá-lo.***

***Permissão negada, replicou o oficial. Não quero que arrisque a
sua vida por um homem que provavelmente está morto.***

***O soldado, ignorando a proibição, saiu, e uma hora mais tarde
regressou, mortalmente ferido, transportando o cadáver de seu
amigo. O oficial estava furioso:***

Já tinha dito que ele estava morto!!!

***Agora eu perdi dois homens! Diga-me valeu a pena trazer um
cadáver?***

E o soldado, moribundo, respondeu:

***Claro! que sim, senhor! Quando o encontrei, ele ainda estava
vivo e pode me dizer:***

Tinha certeza que você viria!

AMIGO É AQUELE QUE CHEGA QUANDO TODO MUNDO JÁ SE FOI

Autor desconhecido