

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA**



**Pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium* spp em indivíduos com estadia em zona endémica de Malária.**

Ana Raquel Lourenço Ferreira

Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

Lisboa, 2013

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA**



**Pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium* spp em indivíduos com estadia em zona endémica de Malária.**

**A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 18 de Dezembro de 2012**

Ana Raquel Lourenço Ferreira

Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

Lisboa, 2013.

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA**



**Pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium* spp em indivíduos com estadia em zona  
endémica de Malária.**

Ana Raquel Lourenço Ferreira

Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

**Orientadores:**

Professora Doutora Rosa Maria Figueiredo Teodósio

Instituto de Higiene e Medicina Tropical; Universidade Nova de Lisboa

Doutor Marcelo Sousa Silva

Instituto de Higiene e Medicina Tropical; Universidade Nova de Lisboa

**Coorientador:**

Professor Doutor Thomas Hanscheid

Faculdade de Medicina de Lisboa

**Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva  
responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de  
Medicina de Lisboa pelos conteúdos apresentados.**

Lisboa, 2013

*“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira?*

*Aquilo que se sabe, saber que se sabe;*

*Aquilo que não se saber, saber que não se sabe:*

*Na verdade é este o saber.”*

Confúncio

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e ao meu irmão Luís, por serem a melhor família do mundo, por me incentivarem, nunca deixaram desistir, pela educação dada, os valores transmitidos e pelo imenso Amor.

Ao meu marido pela compreensão pelas ausências, ajuda, apoio. Ao meu filho, é a fonte de inspiração.

Aos colegas Rita, Bruno, Paula, Patrícia e Sousa pela intervenção primordial na recolha e conservação de amostras, bem como na impressão dos questionários e arquivo dos mesmos. Aos restantes colegas pela compreensão, por facilitarem os horários por forma a elaborar este trabalho. À Márcia pela ajuda fundamental na parte final.

Ao Dr. Joaquim Machado Caetano, Director do laboratório MEDICIL, por ter possibilitado a recolha de amostras e o material necessário para as colheitas, sem as quais não seria possível a elaboração deste trabalho.

À Dra. Marília Tavares da BioRad - Portugal, pela cedência dos kits de ELISA, sem os quais não seria possível a execução da parte laboratorial.

Ao Prof Doutor Hélder Trindade e à Dra. Gracinda de Sousa por todo o apoio manifestado.

Um agradecimento muito especial aos meus orientadores, porque para além de todos os conhecimentos científicos transmitidos e por permitirem a realização da parte laboratorial no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, estiveram sempre disponíveis, mostrando dedicação e entusiasmo durante a orientação deste trabalho. Muito Obrigado.

A todos os que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO.**

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	IV
ÍNDICE	V
LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS	VII
ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Malária – aspectos gerais	1
1.2. Epidemiologia e distribuição geográfica	2
1.3. Biologia do <i>Plasmodium</i> spp	4
1.4. Especies de <i>Plasmodium</i> infectantes para o homem	7
1.5. Quadro Clínico da Malária	8
1.6. Terapêutica da malária	11
1.7. Controlo e prevenção	12
1.8. Malária no viajante	13
1.9. Critérios de selecção de dadores de sangue e malária transmitida por transfusão	18
1.10. Imunopatologia da malária humana	24
1.11. Diagnóstico clinico e laboratorial da malária	35
II. OBJECTIVOS	42
2.1. Objectivos do estudo	42
III. MATERIAL E MÉTODOS	43
	v

3.1. Tipo de estudo	43
3.2. População e amostra	43
3.3. Instrumento de recolha de dados	45
3.4. Processamento e armazenamento das amostras	46
3.5. Determinação de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium</i> spp	46
3.6. Polymerase Chair Reaction (PCR) para identificação de <i>Plasmodium</i> spp e <i>Plasmodium falciparum</i>	48
3.7. Metodologia estatística	50
3.8. Considerações éticas	51
IV . RESULTADOS	52
4.1. Características sociodemográficas	52
4.2. Estadias em países endémicos	52
4.2.1. Estadias em países endémicos e história de malária	52
4.2.2. Viajantes com uma viagem/estadia em países endémicos de malária	55
4.2.3. Viajantes com mais de uma viagem/estadia em países endémicos de malária	58
4.2.4. Residentes em países endémicos de malária	65
4.3. Conhecimentos sobre malária	65
4.3.1. Transmissão da malária	65
4.3.2. Prevenção da malária	70
4.3.3. Período de incubação e quadro clínico inicial	74
4.4. Ensaios laboratoriais para a determinação de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium</i> spp por ELISA e para a pesquisa de <i>Plasmodium falciparum</i> por PCR	77
4.5. Aplicação dos critérios de selecção de dadores de sangue na amostra estudada	88
V. DISCUSSÃO	93
VI. CONCLUSÕES	104
VII. REFERÊNCIAS	107
ANEXOS	119

## LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Figura 1: Distribuição geográfica das zonas endémicas de malária. Fonte: <a href="http://www.rbm.who.int">www.rbm.who.int</a> (consultado Junho 2011) <sup>85</sup> .....	3
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> . Fonte: <a href="http://www.cdc.gov/malaria/biology/lifecycle.htm">www.cdc.gov/malaria/biology/lifecycle.htm</a> (consultado em Julho de 2011).....	5
Figura 3: Sensibilidade dos testes directos de diagnóstico de malária. Adaptado de Seed 2005. <sup>91</sup> .....	41
Figura 4: Pesquisa de <i>Plasmodium falciparum</i> por PCR nas amostras de sangue dos indivíduos serologicamente positivo para <i>Plasmodium</i> spp. A: amplificação da sequência específica para <i>Plasmodium</i> spp; B: amplificação da sequência específica para <i>Plasmodium falciparum</i> . C+ (controlo positivo); C- (controlo negativo).....	78
Gráfico 1: Número de viagens/estadias em países endémicos de malária (n=310). .....	53
Gráfico 2: Intervalo de tempo entre a última estadia nos trópicos e a participação no estudo (total de participantes) (n=310). .....	54
Gráfico 3: Ano da última estadia em países endémicos de malária (n=311). .....	54
Gráfico 4: Países tropicais visitados/estadias pelo grupo com uma estadia em países endémicos de malária. ....	55
Gráfico 5: Motivo da viagem/estadia (viajantes com uma viagem/estadia; n=163). .....	56
Gráfico 6: Duração da estadia em países endémicos de malária (viajantes com uma viagem/estadia).....	56

Gráfico 7: Intervalo de tempo entre o regresso da viagem/estadia e a participação no estudo (viajantes com uma viagem/estadia). .....	57
Gráfico 8: Intervalo de tempo entre o regresso da viagem/estadia e a participação no estudo de acordo com o motivo da viagem (viajantes com uma viagem/estadia).....	58
Gráfico 9: Países tropicais visitados/estadias pelo grupo de viajantes com mais de uma estadia.....	59
Gráfico 10: Motivo da viagem/estadia (viajantes com mais de uma viagem/estadia). .....	59
Gráfico 11: Duração da estadia em países endémicos de malária (viajantes com mais de uma viagem/estadia).....	60
Gráfico 12: Intervalo de tempo entre o regresso da primeira e da última viagem/estadia e a participação no estudo (viajantes com mais de uma viagem/estadia).....	61
Gráfico 13: Intervalo de tempo entre o regresso da última viagem/estadia e a participação no estudo de acordo com o motivo da viagem. ....	62
Gráfico 14: Cuidados para evitar a malária nos respondentes dos géneros masculino e feminino (viajantes com mais de uma viagem/estadia). ....	64
Gráfico 15: Variação da idade nas categorias da variável Transmissão da malária por águas e alimentos. ....	68
Gráfico 16: Variação da idade nas categorias da variável Transmissão da malária por via sexual.....	68
Gráfico 17: <i>Variação da variável idade nas categorias da variável</i> Prevenção da malária evitando a picada dos mosquitos.....	73

Gráfico 18: <i>Variação da variável idade nas categorias da variável</i> Prevenção da malária evitando o consumo de águas e alimentos. ....	73
Gráfico 19: <i>Variação da idade nas categorias da variável</i> Prevenção da malária por vacinação. ....	74
Gráfico 20: Distribuição da frequência de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium</i> spp nas amostras de plasma dos indivíduos estudados. A linha descontínua apresenta o ponto de referência de uma unidade da relação DO/ <i>Cut-off</i> . DO: densidade óptica da reacção a 450 nm; <i>Cut-off</i> : valor de referência determinado em cada reacção de ELISA. ....	77
Gráfico 21: Relação entre o número de anos após o diagnóstico de malária e os valores de densidade óptica (DO) obtidas na reacção para a pesquisa de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium</i> spp. ....	80
Gráfico 22: Relação entre o número de anos após a última viagem/estadia e os valores de densidade óptica (DO) obtidas na reacção para a pesquisa de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium</i> spp. ....	80
Gráfico 23: Variação do tempo desde a última crise de malária nas categorias da variável Serologia para <i>Plasmodium</i> spp. ....	87
Tabela 1: Número de casos de malária importados. ....	17
Tabela 2: Número de casos, de declaração obrigatória, importados de malária, por região entre 2002/2006 ....	17

Tabela 3: Período de suspensão de indivíduos autóctones, provenientes de zonas endémicas, em diferentes países. ....	23
Tabela 4: Período de suspensão de viajantes para áreas endémicas, em função da duração da viagem. ....	23
Tabela 5: Países onde é aplicado um teste de screening de anticorpos do parasita para triagem de dadores de sangue. ....	24
Tabela 6: Condições de reação da nested PCR utilizada para amplificar sequências específicas de <i>Plasmodium</i> spp em amostras de sangue. ....	49
Tabela 7: Sequências nucleotídicas (primers) utilizadas na nested PCR específicas para as espécies de <i>Plasmodium</i> spp. ....	49
Tabela 8: Cuidados para evitar a malária (viajantes com mais de uma viagem/estadia). ....	63
Tabela 9: Percentagem de respostas sobre a forma de transmissão da malária. ....	66
Tabela 10: Comparação das proporções das variáveis “Transmissão por picada de mosquito”, “transmissão por águas e alimentos contaminados” e “transmissão sexual” nas categorias das variáveis “Género” e “Antecedentes de malária” ( $\alpha = 0.05$ ). ....	67
Tabela 11: Comparação das variáveis “Idade”, “Nível educacional” e “Número de viagens” nas categorias das variáveis “Transmissão por picada de mosquito”, “transmissão por águas e alimentos contaminados” e “transmissão sexual” – resultados do teste de Mann-Whitney ( $\alpha=0.05$ ). ....	69
Tabela 12: Percentagem de respostas sobre a forma de prevenção da malária. ....	70

Tabela 13: Comparação das proporções das variáveis de relacionadas com a prevenção “Medicamentos adequados”, “Evitar a picada de mosquito”, “Evitar o consumo de águas e alimentos contaminados” e “Vacinação” nas categorias das variáveis “Género” e “Antecedentes de malária” ( $\alpha = 0.05$ ).....	71
Tabela 14: Comparação das variáveis “Idade”, “Nível educacional” e “Número de viagens/estadias” nas categorias das variáveis relacionadas com a prevenção da malária “Medicamentos adequados”, “Evitar a picada de mosquito”, “Evitar o consumo de águas e alimentos contaminados” e “Vacinação” – resultados do teste de Mann-Whitney ( $\alpha=0.05$ )... 72	72
Tabela 15: Percentagem de respostas sobre o período de incubação e o quadro clínico inicial da malária.....	75
Tabela 16: Características sociodemográficas, estadias em países endémicos, história de malária e resultados laboratoriais nos participantes no estudo com serologia positiva para <i>Plasmodium</i> spp.....	81
Tabela 17: Distribuição dos participantes no estudo consoante a sua história de malária e os resultados serológicos para <i>Plasmodium</i> spp.....	84
Tabela 18: Característica sociodemográfica, estadias em países endémicos, história de malária, ”história de malária e serologia positiva” “história de malária e serologia negativa” e “sem história de malária e serologia positiva” para <i>Plasmodium</i> spp.....	86

## ABREVIATURAS

CSP - *circumsporozoite protein*

Celulas Th – células T auxiliares

DDO – doenças de declaração obrigatória

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO – densidade óptica

EBA – antígeno de ligação ao eritrócito

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

EIA – enzyme immunosorbent assay

ELISA – ensaio imunoenzimático

FcγRI/II – receptor humano para IgG

GPI – glicose fosfato isomerase

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IFA – immunofluorescent antibody assay

Ig – imunoglobulina

HRP – proteína rica em histidina

IL - interleucina

INF - interferão

IPST,IP – Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP

LHD – lactato desidrogenase

MHC – complexo major de histocompatibilidade

NMDA – N-metil-D-aspartato

NK – natural killer

NO – óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

P. - *Plasmodium*

PCR - *polymerase chain reaction*

QBC – quantitative buffy coat

TRD – testes rápidos de diagnóstico

TNF – factor de necrose tumoral

TRAP - *thrombospondin-related adhesive protein*

TRL – toll-like receptor

## RESUMO

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crónica, com manifestações episódicas de carácter agudo, causada por um protozoário do género *Plasmodium*. A transmissão ao homem é feita pela picada da fêmea infectada do mosquito *Anopheles*, por via congénita e transfusional.

A imunidade natural contra o *Plasmodium* é complexa e demora anos a desenvolver; dependendo da frequência e duração da exposição à infecção.

Com este estudo pretende-se: determinar a prevalência de anticorpos anti-*Plasmodium* em indivíduos que viajaram/regressaram de zonas endémicas, relacionar a presença de anticorpos com variáveis sociodemográficas, de caracterização da viagem/estadia e história de malária, caracterizar a diferença de taxas de aprovação de dadores, entre a utilização de um teste imunológico e a triagem baseada em critérios clínicos, considerando o grupo estudado como dadores de sangue, caracterizar conhecimentos, atitudes e práticas sobre malária e sua prevenção.

Participaram no estudo 312 indivíduos, 2/3 eram do género masculino, 3/4 tinham idade inferior a 50 anos, 2/3 tinham grau de licenciado ou superior, 3/4 era natural de Portugal. Metade fez apenas uma viagem/estadia em países endémicos de malária, apresentando um intervalo de tempo superior a três anos entre o regresso e o estudo.

20,1% dos que participaram no estudo tinham história de malária, mas apenas 9,4% apresentavam serologia positiva para anticorpos totais anti-*Plasmodium*. Este subgrupo foi testado por PCR para identificação de *Plasmodium* spp e *Plasmodium falciparum* obtendo-se resultados negativos.

Desta forma, os indivíduos ainda apresentam anticorpos em circulação apesar de maioritariamente o regresso ter sido há mais de três anos; nenhum dos participantes com serologia positiva tem o parasita em circulação.

Se os participantes no estudo forem considerados hipotéticos dadores de sangue verifica-se uma maior taxa de aprovação quando aplicado aos visitantes assintomáticos de zonas endémicas de malária apenas um teste serológico como consta na Norma de Serviço nº 1 de 15/04/2012, do IPST,IP.

**Palavras-chaves:** Malária, *Plasmodium falciparum*, ELISA, dadores de sangue

## ABSTRACT

Malaria is an infectious, non-contagious disease with chronic evolution and episodic manifestations with acute features, caused by a protozoan of the genus *Plasmodium*. It is transmitted to man by the bite of infected female *Anopheles* mosquito, via transfusion or fetal infection, i.e. congenital malaria.

Natural immunity against *Plasmodium* sp. is complex and takes years to develop, depending on the frequency and duration of exposure.

The aim of this work is to determine the prevalence of antibodies anti-*Plasmodium* sp. in individuals traveling or returning from endemic areas; to relate the presence of antibodies with socio-demographic variables, characterizing travels/stays and history of malaria; to feature the different rates of approval of donors, between the use of an immunoassay screening and trial based on clinical criteria, considering the group studied as blood donors; to describe knowledge, attitudes and practices about malaria and its prevention. Of 312 individuals who participated in the study, two thirds were male, three quarters were aged under 50 years, two thirds had a graduation or higher degree and three quarters were born in Portugal. Half of them, made only one trip/ stay in endemic countries, with a time interval of more than three years between the return and study.

20.1% of those who participated in the study had a history of malaria, but only 9.4% had positive serology for total anti-*Plasmodium*. This subgroup was tested by PCR to identify *Plasmodium falciparum* and the other species; they all gave negative results.

Despite returned for more than 3 years of endemic countries, most individuals still has circulating antibodies, but none presents the parasite in circulation.

If participants in the study are considered possible blood donors, there is a higher approval rate (when applied to asymptomatic visitors in endemic areas) of a serological test as stated in the portuguese stardard of service number 1 of 15/04/2012, from the IPST,IP.

**Keywords:** Malaria, *Plasmodium falciparum*, ELISA, blood donors

# I. INTRODUÇÃO

## 1.1. Malária – aspectos gerais

A Malária ou Paludismo é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crónica, com manifestações episódicas de carácter agudo.

Esta é uma doença tão antiga como a humanidade, mas o seu agente só foi descoberto em 1880 por Charles Louis Alphonse Laveran<sup>99</sup>. Em Portugal existiu malária endémica até 1960, nomeadamente na região do Douro. Neste momento tanto Portugal como outros países da Europa estão em risco de poder vir a ter novos casos de malária.

A malária é causada por um protozoário do género *Plasmodium* (P.), sendo que as cinco espécies que causam doença no homem são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*. Esta última espécie foi descoberta em 1965 no Sudoeste da Ásia. A transmissão ao homem (hospedeiro) é feita através de picada de um mosquito fêmea (vector) do género *Anopheles*. Contudo, pode também ocorrer transmissão por via transfusional ou via congénita<sup>54</sup>.

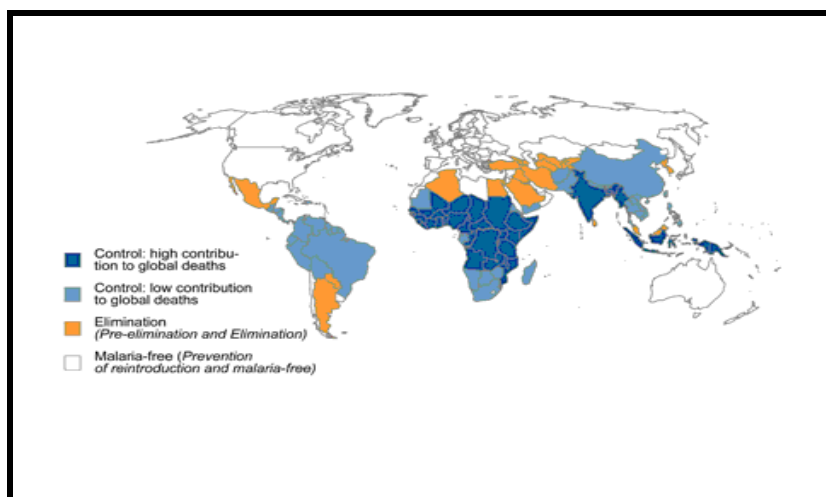
O mosquito habita preferencialmente em zona húmidas (a água é necessária para depositar os ovos e para estes eclodirem) a temperatura a rodar os 25°C, o que acelera o crescimento do parasita dentro do mosquito.<sup>83</sup> O mosquito do género *Anopheles* está distribuído por todo o mundo à exceção da Antártida. A malária é transmitida por diferentes espécies deste mosquito, dependendo da região e do ambiente, com diferentes capacidades de transmissão vectorial. O *Anopheles* que transmite a malária não existe só em áreas onde a malária é endémica, existe também em zonas onde a doença já foi erradicada, estando assim, estas áreas em constante risco de reintrodução da doença.<sup>83</sup> Os mosquitos fêmeas também se alimentam de fontes de açúcar, mas necessitam de fazer pelo menos uma refeição de sangue para o

desenvolvimento dos ovos. O parasita *Plasmodium* está presente nas glândulas salivares, sendo injectado na circulação sanguínea no momento em que a fêmea pica para se alimentar. Os principais determinantes da epidemiologia da malária são a densidade (o número), os hábitos de picar os seres humanos e a longevidade dos mosquitos vectores.<sup>107</sup> Dependendo da temperatura média, a transmissão pode ocorrer durante todo o ano ou ser sazonal, pois a temperatura mínima para a reprodução do *P. falciparum* é 18° C.<sup>18</sup> Os mosquitos picam do anoitecer ao amanhecer, são mais agressivos entre as 20.00 e as 03.00.<sup>23</sup> Verificando-se que na África Subsaariana 80-90% das picadas dos mosquitos ocorrem após a meia-noite.<sup>18</sup>

## **1.2. Epidemiologia e distribuição geográfica**

A malária é uma doença muito comum nas regiões tropicais e subtropicais (figura 1). Anualmente ocorrem 250 milhões de casos de malária e aproximadamente um milhão de mortes. Cerca de 3,3 biliões de pessoas (metade da população mundial) correm o risco de contrair a doença. É uma doença extremamente grave em África onde 20% das crianças morrem devido a complicações da malária. Morre uma criança a cada 30 segundos.

Existem cerca de 100 países com risco de transmissão de malária, que são visitados anualmente por mais de 125 milhões de viajantes e dos quais 10000 adoecem depois do regresso a casa.<sup>103</sup>



**Figura 1:** Distribuição geográfica das zonas endémicas de malária. Fonte: [www.rbm.who.int](http://www.rbm.who.int) (consultado Junho 2011)<sup>85</sup>

O risco de transmissão de malária não está distribuído e forma homogénea dentro de cada país, pois no mesmo país há zonas que são endémicas para a malária e outras onde não ocorre a transmissão.<sup>19</sup>

A malária encontra-se principalmente em climas quentes e húmidos (áreas tropicais e subtropicais), isto porque a temperatura e humidade são fundamentais para o desenvolvimento do mosquito vector. A área onde ocorre maior transmissão é a África a Subsaariana e em zonas da Oceânia como a Papua Nova Guiné. Em regiões onde há uma variação anual da temperatura a transmissão é sazonal e a espécie de *Plasmodium* que mais se adapta a estas circunstâncias é o *P. vivax*.

Na Europa ocidental e nos Estados Unidos da América conseguiu-se eliminar a doença, mas o vector continua a existir por isso a reintrodução da doença é um risco constante.

África é o continente mais afectado pela doença devido a uma conjugação de factores: o vector é muito eficiente, elevada taxa de transmissão do parasita, a espécie *P. falciparum*

(predominante) é causadora das formas graves da doença, condições climáticas, falta de recursos socioeconómicos, elevada taxa de associação com outras doenças (HIV, tuberculose, doenças gastrointestinais).<sup>56</sup>

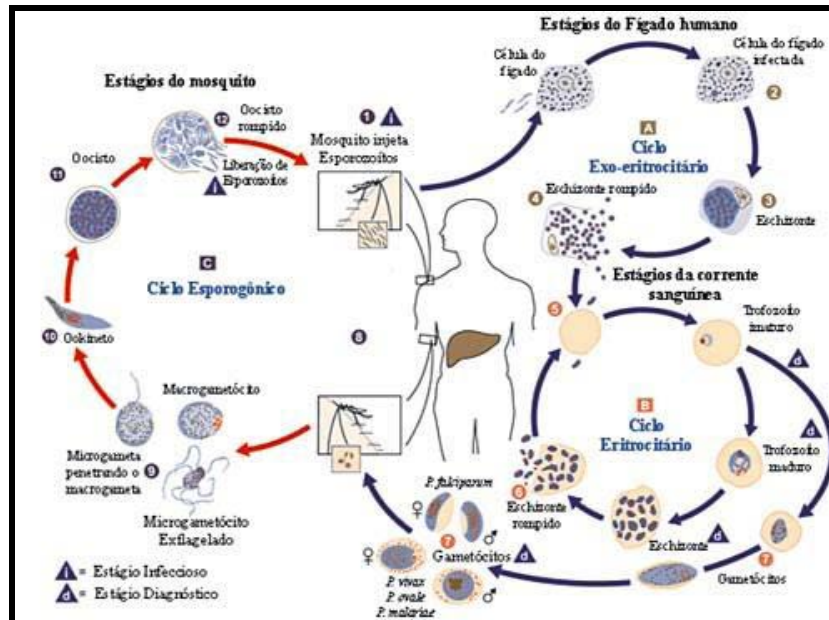
A forma mais severa de malária humana é causada pelo *P. falciparum*, sendo a principal causa de morte em crianças com idade inferior a cinco anos na África Subsaariana. A malária menos comum é causada pela espécie *P. ovale* que está restrita ao oeste de África ocidental, enquanto que a espécie *P. malariae* é encontrada em todo o mundo mas tem uma baixa frequência. O parasita da malária mais frequente em todo o mundo é o *P. vivax* cujas infecções raramente são fatais. Há locais onde existe sobreposição de diferentes espécies, *P. falciparum* é mais comum em África, e o *P. vivax* é mais comum no subcontinente indiano América Central e do Sul. A malária afecta cerca de 108 países em todo o mundo, sendo que algumas das principais regiões são: África, Amazónia, América central e sul, sul, centro e sudeste asiático, e o Pacífico.<sup>103</sup>

Existe o risco de alastramento devido á destruição das estruturas de saúde, aumento do número de refugiados, resistência aos antimaláricos/insecticidas, alterações climáticas.

### **1.3. Biologia do *Plasmodium* spp**

O ciclo de vida do parasita da malária envolve dois hospedeiros: o homem e o mosquito (figura 2). Durante uma refeição de sangue, o mosquito do género *Anopheles* infectado com a malária inocula os esporozoítos no hospedeiro humano. Dos esporozoítos inoculados aproximadamente 70% atingem a circulação sanguínea e os outros 30% invadem o sistema linfático, apesar de alguns desenvolverem formas semelhantes às exoeritrocíticas, são fagocitados pelas células dendríticas.<sup>81</sup> Os esporozoítos dividem-se por esquisobolia e

formam uma célula gigante multinucleada, esquizonte, que se divide em várias células, merozoítos, que acabam por romper e lesar o hepatócito. Estes merozoítos voltam a entrar em novos hepatócitos e o processo repete-se.<sup>6,94,110</sup>



**Figura 2:** Ciclo de vida do *Plasmodium*. Fonte: [www.cdc.gov/malaria/biology/lifecycle.htm](http://www.cdc.gov/malaria/biology/lifecycle.htm) (consultado em Julho de 2011).

Estudos recentes mostram que os esporozoítos passam por vários hepatócitos antes da invasão e consequente desenvolvimento hepático.<sup>75,94</sup> Através da circulação sanguínea os esporozoítos migram até ao fígado onde atravessam as células de Kupffer através do vacúolo parasitofaro, penetrando nos hepatócitos. Duas das principais proteínas de superfície dos esporozoítos, a *circumsporozoite protein* (CSP) e a *thrombospondin-related adhesive protein* (TRAP) ligam-se a proteoglicanos de sulfato de heparina da superfície dos hepatócitos durante a invasão.<sup>71</sup> O processo de invasão envolve proteínas de superfície do esporozoíto, como domínios de trombospondina na proteína circunsporozoítica e a proteína relacionada à adesão à trombospondina, bem como moléculas de superfície do hospedeiro vertebrado. A proteína circunsporozoítica reveste toda a membrana plasmática do esporozoíto e alguns dos seus

domínios ligam-se aos proteoglicanos sulfato de heparina, que se projectam do endotélio sinusoidal dos hepatócitos, bem como às células de Kupffer.<sup>94</sup>

Esta fase do ciclo corresponde ao período de incubação da doença e dura em média duas a quatro semanas, mas este período varia de espécie para espécie: 7 a 10 dias para *P. falciparum*, 10 a 17 para *P. ovale* e *P. vivax* e para *P. malariae* pode durar 18 a 40 dias, mas pode ser superior. No caso dos *P. ovale* e *P. vivax* alguns merozoítos sofrem esquizogonia, enquanto que outros ficam em estado de latência no fígado (hipnozoítos). Estes hipnozoítos são responsáveis pela recorrência da doença após períodos variáveis de incubação.<sup>63</sup>

Alguns destes merozoítos, em vez de estarem nos hepatócitos vão para a corrente sanguínea e parasitam os eritrócitos iniciando o ciclo eritrocitário. Dentro do eritrócito o parasita adquire a forma de anel (trofozoítos) vai amadurecendo e vai sofrer um processo semelhante ao que aconteceu nos hepatócitos, passando a ser um esquizonte precoce, depois um esquizonte tardio que se divide nos merozoítos que vão romper e lesar o eritrócito. Estes merozoítos vão entrar em novos glóbulos vermelhos e sofrem diferenciação em gametócitos. Esta fase do ciclo é responsável pelas manifestações clínicas da doença.<sup>26</sup>

Ao picar o hospedeiro infectado com *Plasmodium* spp a fêmea do mosquito aspira sangue contendo gametócitos. Ao nível do intestino vai realizar-se a fusão entre o macro-gâmeta (feminino) e o micro-gâmeta (masculino) e assim inicia-se o ciclo sexuado do parasita no mosquito, isto é, o mosquito é o hospedeiro definitivo e o homem é apenas hospedeiro intermédio.<sup>102</sup> Da fusão dos gâmetas resulta o zigoto. O zigoto por sua vez, torna-se móvel e alongado invadindo a parede do intestino onde se desenvolvem os oocistos. Os oocistos crescem e dá-se a ruptura e libertação dos esporozoítos que fazem o seu caminho para as glândulas salivares do mosquito – ciclo esquizogónico.<sup>102</sup>

A inoculação dos esporozoítos no novo hospedeiro humano perpetua o ciclo de vida do *Plasmodium* spp.

#### **1.4. Espécies de *Plasmodium* infectantes para o homem**

Existem cinco espécies de *Plasmodium* spp que podem causar infecção no homem.

*Plasmodium falciparum*: espécie mais frequente, é encontrado em todo o mundo em áreas tropicais e subtropicais, causadora de maior morbidade e mortalidade. Estima-se que em cada ano um milhão de pessoas morrem por malária causado por *P. falciparum*, especialmente em África onde esta espécie predomina, a infecção tem um período de incubação de 8 dias. Pode causar malária grave porque se multiplica rapidamente no sangue causando uma rápida destruição dos eritrócitos e consequente anemia. Os trofozoítos tornam os glóbulos vermelhos aderentes (citoaderência ao endotélio) levando à obstrução dos capilares, nomeadamente dos capilares renais provocando insuficiência renal aguda que posteriormente se torna crónica devido às sucessivas crises de malária; obstrução dos capilares pulmonares e cerebrais, sendo a malária cerebral uma forma mais grave e que pode causar a morte.<sup>103</sup>

*Plasmodium vivax*: é encontrado especialmente nos trópicos, subtropicos e zonas temperadas, raramente em África, a infecção tem um período de incubação de 10 a 15 dias. Devido à densidade populacional, especialmente, na Ásia, é a espécie de parasita da malária mais prevalente entre os humanos.<sup>60</sup> Causa elevada morbidade mas raramente é letal.

No caso do *P. vivax* e *P. ovale*, alguns merozoítos não entram na corrente sanguínea e permanecem quiescentes nos hepatócitos. Passam a designar-se por hipnozoítos; passado algum tempo o indivíduo infectado pode voltar a ter crises de malária, isto é, recaída por

invasão periódica do sangue por merozoítos com origem nos hipnozoítos.<sup>62</sup> Pode causar malária crónica (hipnozoítos no fígado).

*Plasmodium ovale*: é encontrado na África ocidental e tropical, nas ilhas do Pacífico ocidental, a infecção tem um período de incubação 11 a 16 dias. Biologicamente e morfológicamente são muito semelhantes ao *P. vivax*. No entanto é diferente no facto de não poder infectar pessoas que são Duffy negativo, caso de muitos habitantes da África subsaariana, o que explica a maior prevalência de *P. ovale* em relação a *P. vivax* na região endémica do continente africano.

*Plasmodium malariae*: pode ser encontrado na zonas tropicais e subtropicais (distribuição fragmentada), é a espécie menos comum; é a única espécie de parasita da malária que tem um ciclo quaternário, a infecção tem um período de incubação 28 a 37 dias. No caso de *P. malariae* alguns merozoítos permanecem quiescentes nos glóbulos vermelhos, ou na medula óssea, portanto não se refaz o ciclo exoeritrocítico, e podem voltar à circulação.<sup>83</sup>

*Plasmodium knowlesi*: encontrado no Sudoeste Asiático, especialmente na Malásia. O *P. knowlesi* tem um ciclo de replicação de 24 horas por isso pode passar rapidamente de uma infecção simples para grave<sup>42</sup>, transmitida pela picada do mosquito *Anopheles leucosphyrus*.

Em todas as espécies de parasita pode ocorrer recrudescência (revitalização do ciclo esquizogonia eritrocitário) e é variável consoante a espécie:

*P. falciparum* 1 a 2 anos, *P. vivax* e *P. ovale* 4 a 5 anos e *P. malariae* até 50 anos.<sup>58</sup>

### **1.5. Quadro Clínico da Malária**

A malária pode ter uma grande variedade de sintomas que vão desde a ausência de sintomas ou leve sintomatologia até à doença grave ou mesmo a morte. Em geral a malária é uma

doença curável se diagnosticada e tratada adequadamente e rapidamente. As manifestações clínicas podem ser classificadas como não complicadas ou complicadas segundo critério da Organização Mundial de Saúde.<sup>104</sup>

Os sintomas clínicos associados à malária são causados pelo ciclo esquizogónico eritrocitário do parasita. Quando o parasita se desenvolve há uma destruição dos eritrócitos parasitados e a libertação na circulação sanguínea dos parasitas e dos produtos de degradação dos glóbulos vermelhos. Um dos produtos que libertado é o pigmento hemozoína e outros produtos tóxicos que se acumulam nos glóbulos vermelhos do sangue infectado. A hemozoína e outros factores tóxicos como o Glicose Fosfato Isomerase (GPI) estimulam os macrófagos e outras células a produzir citocinas e outros factores solúveis que causam o aparecimento de febre, calafrios e influenciam a fisiopatologia de formas graves da doença.

No caso do *P. falciparum* ocorre a sequestração dos glóbulos vermelhos infectados com trofozoítos maduros, que aderem ao endotélio vascular na microcirculação de órgãos vitais. Este fenómeno de citoaderência interfere na circulação sanguínea, bem como na oxigenação e metabolismo dos tecidos. Quando este sequestro dos eritrócitos infectados ocorre a nível do cérebro é a causa da malária grave e está associado a uma elevada taxa de mortalidade.<sup>71</sup>

O período de incubação é o espaço de tempo entre a picada do mosquito infectado e o aparecimento dos primeiros sintomas. Na maioria dos casos esse período varia entre 7 a 30 dias, sendo que o mais curto é no caso do *P. falciparum* e o mais longo no *P. malariae*.

Os primeiros sintomas apresentados são idênticos ao quadro de um síndrome gripal, podendo haver tremores de frio seguidos da rápida subida da temperatura corporal, este aumento da temperatura é frequentemente acompanhado por náuseas, vômitos, cefaleias, dores musculares e abdominais, anemia, falta de apetite, distúrbios gastrointestinais.<sup>99</sup> Durante o

período de febre alta pode ocorrer o processo de esplenomegalia, quando a temperatura começa a baixar o doente começa a apresentar intensa sudorese que se pode prolongar por vários minutos ou horas – sintomas característicos de malária não grave.<sup>25,103</sup>

O ciclo de sintomas (frio, febre e sudorese) repete-se em diferentes intervalos de tempo, de acordo com o tipo de *Plasmodium* infectante:<sup>73, 83</sup>

- 36 a 48 horas *P. falciparum* (terçã maligna)
- 48 em 48 horas *P. ovale* e *vivax* (terçã benigna)
- 72 em 72 horas *P. malariae* (quartã)

A quimioprofilaxia da malária pode retardar o aparecimento de sintomas por semanas ou meses, depois do viajante ter deixado a zona endémica. O tipo de sintomas e os atrasos nas manifestações clínicas da doença podem causar erros no diagnóstico.<sup>62</sup>

A malária grave ocorre quando são afectados órgãos vitais com falência dos mesmos e há presença de alterações no sangue do paciente tais como: anemia grave, hemoglobinúria, alteração na coagulação, acidose metabólica, hipoglicémia, hiperparasitemia, dificuldade respiratória, perda de consciência, convulsão, coma ou outras alterações neurológicas.<sup>2</sup>

No caso de infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, o paciente pode ter recuperado do primeiro episódio da doença mas mais tarde voltar a ter recaídas após meses ou anos sem sintomas, isto porque estas espécies de parasita podem ficar dormentes no fígado (hipnozoitos) e posteriormente entrar em circulação e desencadear novas crises.<sup>62</sup>

## **1.6. Terapêutica da malária**

O tratamento depende de diferentes factores tais como: gravidade da doença, espécie de parasita, região geográfica onde ocorreu a infecção, resistência aos fármacos, idade, se for mulher gravidez. É muito importante saber qual é a espécie de parasita que está a causar a infecção porque:

1. *P. falciparum* e *P. knowlesi* podem causar a forma mais grave da doença e levar á morte.
2. *P. ovale* e *P. vivax* podem ficar hipnozoitos no fígado e provocar recaídas
3. *P. falciparum* e *P. vivax* têm padrões de resistência á terapia em função das regiões geográficas

A malária não grave causada por *P. falciparum* e por outras espécies adquiridas em áreas sem resistência à Cloroquina pode ser tratada com Cloroquina oral ou Hidroxicloroquina. Mas se a doença for contraída em áreas com resistência á Cloroquina deve ser administrado Malarone® (Atovaquone- Proguanil), Artemeter- Lumefantrina (Coarten), Sulfato de quinina mais Doxiciclina, Tetraciclina ou Mefloquina.<sup>103</sup>

Se nas infecções em que inicialmente não foi identificada a espécie de parasita for posteriormente identificada como *P. vivax* ou *P. ovale* deve fazer terapia adicional com Primaquina.<sup>103</sup>

Se a infecção for causada por *P. malariae* ou *P. knowlesi* e se não houver nenhuma evidência de resistência á Cloroquina, pode ser tratado com Cloroquina ou Hidroxicloroquina. O mesmo se pode aplicar ao *P. vivax* e *P. ovale* se não for contraído em zona de resistência, mas nestes

casos deve ser feita terapia com Fosfato de Primaquina durante 14 dias para evitar possíveis recaídas causadas pelos hipnozoítos presentes no fígado.<sup>103</sup>

### **1.7. Controlo e prevenção**

Os principais objectivos dos programas para controlo da malária são: redução da incidência da doença, redução da mortalidade, redução das formas graves da doença, redução da transmissão, manutenção da ausência de transmissão nos locais onde se conseguiu a sua erradicação.

Para que tais objectivos sejam alcançados são definidos alguns elementos fundamentais:<sup>2</sup>

1. Diagnóstico precoce e tratamento imediato e adequado dos casos de doença, especialmente dos casos graves. Este procedimento garante a prevenção de casos fatais, redução do aparecimento de casos graves, redução da fonte de infecção e diminuição da transmissão, mantendo a doença em níveis endémicos e epidemiológicos socialmente suportáveis. Um dos problemas do controlo da malária é o aumento de resistência aos fármacos, visto até à data não existir vacina eficaz.
2. Controlo selectivo dos vectores, que compreende o manejo adequado do ambiente, o tratamento químico dos domicílios e dos espaços abertos. O manejo adequado do ambiente pode reduzir a densidade de anofelinos, eliminando os locais de criação, por meios de limpeza e drenagem da vegetação. O bom saneamento é uma medida eficaz para o controlo da malária. O tratamento químico domiciliar foi uma das principais medidas de intervenção na estratégia de erradicação, e ainda hoje é um importante instrumento de controlo dos vectores. O tratamento químico dos espaços abertos é

indicado em situações especiais onde a densidade anofélica é bastante elevada e quando o tratamento químico domiciliar e o manejo ambiental não foram eficazes para a redução dos vectores. É feito através da aplicação espacial de insecticida e nebulização térmica. É uma medida de alto custo e com grande impacto ambiental desfavorável.

3. Medidas de protecção individual como uso de repelente, uso de roupa e acessórios apropriados, uso de mosquiteiro impregnado ou não com insecticida, selagem das portas e janelas das casas e melhoria das habitações.
4. Detecção precoce de epidemias e aplicação de medidas eficazes para o seu controlo.
5. Detecção precoce, contenção e prevenção da reintrodução da doença em áreas não endémicas ou em áreas onde a transmissão já foi interrompida.

### **1.8. Malária no viajante**

Atualmente a malária é endémica em mais de 100 países, que são visitados por mais de 125 milhões de viajantes internacionais por ano. Estima-se que 10000 tenham contraído malária após o regresso a casa.<sup>103</sup> Viajantes internacionais de zonas endémicas provenientes de países não endémicos apresentam um elevado risco porque não têm imunidade. Imigrantes de áreas endémicas que regressam ao seu país de origem para visitar amigos ou parentes têm um maior risco de exposição devido ao facto de tomarem menos medidas preventivas e expondo-se mais a contrair a doença. No entanto, a persistência de imunidade após alguns anos sem exposição pode também contribuir para alguma protecção destes viajantes.<sup>35</sup>

Segundo a Organização Mundial de Saúde, entre 2005 e 2009 África cresceu como destino de eleição dos viajantes de 35,4 milhões para 46 milhões.<sup>30,48</sup> A Ásia e a região do Pacífico crescerem como destino de eleição de 153,6 milhões para 181,2 milhões entre 2005 e 2009, e a América cresceu entre 134,1 e 140,6 milhões como destino de eleição dos viajantes.<sup>76</sup>

O risco de transmissão de malária não está distribuído homogeneamente dentro dos diferentes países, podendo ocorrer em todo o país ou limitar-se a certas regiões. A OMS no relatório mundial da malária, editado em 2009 divide as áreas de malária em três níveis de endemicidade:<sup>105</sup>

- Áreas com alta transmissão, onde a incidência de malária por todas as espécies de *Plasmodium* spp é de 1 por 1000
- Áreas com baixa transmissão, onde a incidência da malária por todas as espécies de *Plasmodium* spp é menor que 1 por 1000
- Áreas sem malária, onde não ocorrem casos de malária autóctone (adquirida na comunidade local), há vários anos e onde todos os casos sinalizados de malária são importados

Segundo a OMS, entre 2005 e 2009 houve uma diminuição dos casos de malária autóctone, de 244 milhões para 225 milhões. A maior redução de casos verificou-se na Europa (Azerbaijão, Geórgia, Quirguistão, Tajiquistão e Turquia) seguida pelo continente Americano. O maior número de casos continua a ocorrer em África (78%) e Sudeste Asiático (15%).<sup>106</sup> Muito recentemente foram identificados casos de malária autóctone, causada por *P. vivax*, na Grécia.<sup>27</sup>

A situação da malária na região europeia segundo a OMS é heterogénea, do ponto de vista epidemiológico. Há países com malária endémica como a Turquia, e outros países sem malária desde há décadas, onde se observaram recentemente casos autóctones. Na União Europeia a maioria dos casos são importados. Estes casos têm vindo a aumentar ao longo da última década, principalmente devido ao aumento da imigração, das viagens intercontinentais, do aumento da resistência aos anti-maláricos e do aumento da endemia especialmente em África.<sup>17, 49</sup>

Desde a erradicação oficial da malária em Espanha em 1964, que os casos que têm sido declarados são de malária importada; recentemente foi descrita, neste país, uma incidência de 0,92 por 100000 habitantes e 73% dos casos proveem da Africa Subsaariana.<sup>7, 45</sup> Em Itália foram declarados 5219 casos entre 2000 e 2006, sendo que destes 3696 ocorreram em viajantes e 1523 em residentes. A maior parte dos casos importados provem de África e foi causada por *P. falciparum* (83%). Foram descritos cinco casos autóctones causados por transfusão, transplante, contaminação nosocomial.<sup>86</sup>

Nos Estados Unidos da América são declarados por ano cerca de 1500 casos, de malária importada, causada principalmente por *P. falciparum* seguida de *P. vivax*. Entre 1963 e 2001, nos Estados Unidos da América morreram 185 pessoas por causa de malária importada.<sup>43,74</sup>

A OMS considerou a malária autóctone erradicada de Portugal em 1973. No entanto desde 1958 que não se observam casos autóctones em Portugal. Nos anos 30 existia malária em muitos distritos portugueses, altura em que foram realizadas várias campanhas para controlo dos vectores de transmissão, das quais se destaca a introdução do peixe *Gambusia sp.* nos criadouros de larvas, a utilização do inseticida *Dicloro-Difenil-Ttriclороetano* (DDT), o

controle da irrigação dos campos de arroz. Após a declaração da erradicação da doença só foi detetado mais um caso, em 1975, no concelho de Aljustrel, distrito de Beja.<sup>16, 17</sup>

Atualmente são conhecidas em Portugal cinco espécies de mosquitos potencialmente transmissoras da doença, sendo o *Anopheles artroparvus* a espécie em maior abundância, e que pode ser encontrada em todo o país.<sup>4</sup>

O aumento do número de viajantes internacionais para zonas tropicais endémicas leva a um aumento do risco de contrair a doença que está relacionada com o itinerário e o alojamento do viajante, dependendo também da taxa de transmissão na área geográfica de destino. A estação do ano também afecta o risco porque a transmissão segue os modelos sazonais ligados à pluviosidade. A altitude do destino é igualmente importante porque acima dos 2000 metros dificilmente ocorre transmissão. O mosquito pica ao anoitecer e amanhecer pelo que o risco é influenciado pelas atividades noturnas do viajante.

No nosso país existem diversas consultas de Medicina do Viajante que proporcionam aconselhamento sobre medidas preventivas de infecção a adoptar pelos viajantes internacionais. A vigilância epidemiológica da malária de importação contribui para manter o alerta sobre a incidência e os fatores de risco da doença nos viajantes, fornecendo a evidência científica necessária à adoção de medidas de intervenção. Em Portugal, a malária é uma doença que está incluída no Sistema de Vigilância de Doenças Transmissíveis de Declaração Obrigatória (DDO).<sup>17</sup> Os dados sobre a situação atual da doença em Portugal são de difícil acesso, por vezes há uma subnotificação da doença. Nas seguintes tabelas são apresentados os números de caso importados de malária desde 1995 a 2008.<sup>29, 32</sup> (Tabela 1 e 2)

**Tabela 1:** Número de casos de malária importados.

1995		2006		2007		2008	
Nº	%000	Nº	%000	Nº	%000	Nº	%000
<b>81</b>	0,8	42	0,4	43	0,3	45	0,42

Fonte: DGS-DSEES www.dgs.dsees (consultado em Fevereiro de 2012)

**Tabela 2:** Número de casos, de declaração obrigatória, importados de malária, por região entre 2002/2006

REGIÕES E SUB-REGIÕES	2002	2003	2004	2005	2006
<i>NORTE</i>	18	11	12	14	12
Braga	1	3	3	-	-
Bragança	-	-	2	-	-
Porto	16	6	7	14	12
Viana do Castelo	1	2	-	-	-
Vila Real	-	-	-	-	-
<i>CENTRO</i>	6	5	10	7	7
Aveiro	2	2	5	1	1
Castelo Branco	-	1	-	-	-
Coimbra	3	2	3	1	1
Guarda	-	-	-	1	-
Leiria	-	-	2	4	5
Viseu	1	-	-	-	-
<i>LISBOA E VALE DO TEJO</i>	49	29	25	29	20
Lisboa	38	22	20	21	17
Santarém	3	1	-	-	-
Setúbal	8	6	5	8	3
<i>ALENTEJO</i>	-	1	-	1	1
Beja	-	-	-	-	1
Évora	-	-	-	1	-
Portalegre	-	1	-	-	-
<i>ALGARVE / Faro</i>	4	1	2	-	1
<i>RA DOS AÇORES</i>	2	2	-	-	1
<i>RA DA MADEIRA</i>	1	-	-	1	-
<i>PORTUGAL</i>	80	49	49	52	42
<i>Estrangeiro</i>			5		x

Fonte: DGS-DSEES www.dgs.dsees (consultado em Fevereiro de 2012)

### **1.9. Critérios de selecção de dadores de sangue e malária transmitida por transfusão**

A dádiva de sangue considera-se voluntária e não remunerada se a pessoa der sangue, plasma ou componentes celulares por sua livre vontade, não recebendo qualquer pagamento em dinheiro ou substituto deste. Isto inclui o tempo fora do trabalho não necessário para a dádiva. Pequenas ofertas, refeições leves e reembolsos dos custos directamente decorrentes da deslocação são compatíveis com a dádiva voluntária e não remunerada.<sup>9</sup>

O principal objectivo de seleccionar indivíduos para a dádiva de sangue e componentes é determinar se a pessoa é saudável, de modo a salvaguardar a sua saúde e a saúde do receptor. Todos os dadores deverão ser submetidos a um exame médico que permita avaliar a sua aptidão.

Só pessoas saudáveis e com uma boa história médica deverão ser aceites como dadores de sangue para fins terapêuticos. Os dadores devem ter entre 18 e 65 anos de idade, mais de 50Kg de peso, valores de hemoglobina 125g/l no caso das mulheres e 135g/l no caso dos homens. Aquando da dádiva é retirada uma quantidade de 450 ml  $\pm$  10%.<sup>9</sup>

Geralmente, não é possível realizar um exame médico físico e psíquico completo dos dadores. Tem de se confiar nas suas respostas a questões simples acerca da sua história médica, saúde geral, estilos de vida relevantes e testes de laboratório realizados. É feito um exame objectivo sumário com medição da tensão arterial, auscultação cardíaca e doseamento dos níveis de hemoglobina.

Sendo essencial, para uma efectiva detecção, questionar o dador acerca do(s) país(es) onde nasceu, onde foi criado ou que visitou, cada serviço de sangue deve ter uma lista actualizada das áreas endémicas de malária.

Seguem-se os critérios de selecção de dadores segundo a associação portuguesa de imunohemoterapia:<sup>9</sup>

- pessoas que viveram ininterruptamente numa zona afectada pela malária por um período de seis meses ou mais, em qualquer altura da vida. Estas pessoas podem tornar-se portadores assintomáticos do parasita da malária, logo, as seguintes regras ter-lhes-ão de ser aplicadas depois de cada regresso de uma zona de malária. Poderão ser aceites como dadores de sangue, se o resultado de um teste imunológico validado para anticorpos ao parasita da malária, realizado, pelo menos, quatro meses após a última visita a uma zona de malária, for negativo. Se o teste for positivo, o dador deverá ser permanentemente excluído. Se não for realizado nenhum teste, o dador deverá ser permanentemente excluído.
- pessoas com história clínica de malária devem ser excluídas até cessarem os sintomas e tratamento. Poderão ser aceites se o resultado de um teste imunológico validado para anticorpos ao parasita da malária, realizado, pelo menos quatro meses desde a cessação do tratamento/últimos sintomas, for negativo. Se o teste for positivo, o dador deve ser excluído e poderá ser reavaliado três anos depois. Se não for realizado nenhum teste, o dador deverá ser permanentemente excluído.
- pessoas que apresentem doença febril não diagnosticada compatível com malária durante ou no espaço de seis meses após o fim de uma visita a uma zona endémica poderão ser admitidas como dadores de sangue se tiverem um resultado negativo válido para o teste imunológico de pesquisa de anticorpos da malária. Realizado pelo menos, quatro meses após o fim dos tratamentos ou últimos sintomas. Se o resultado for positivo o dador deve ser reavaliado três anos depois. Se não for realizado nenhum teste o dador deve ser excluído durante três anos.
- pessoas assintomáticas que tenham visitado uma zona endémica de malária poderão ser aceites para dar sangue se o resultado do teste imunológica válido para anticorpos

do parasita da malária for negativo, numa amostra colhida, pelo menos, quatro meses após a última visita a uma zona endémica de malária. Se o resultado for positivo o dador deverá ser excluído e reavaliado três anos depois. Se não for realizado nenhum teste o dador poderá ser readmitido doze meses após o regresso da zona endémica.

Neste momento em Portugal o Decreto-Lei nº267/2007, que refere os critérios de selecção de dadores de sangue, diz o seguinte:<sup>28</sup>

- Indivíduos que viveram numa zona com paludismo durante os cinco primeiros anos de vida – três anos após o regresso da última visita à zona endémica, desde que assintomático; o período de suspensão pode ser reduzido para quatro meses se o teste imunológico ou de genoma molecular para cada dádiva for negativo.
- Indivíduos com antecedentes de paludismo – suspensão da dádiva de sangue durante três anos após a cessação do tratamento e ausência de sintomas. Aceite posteriormente apenas se o teste imunológico ou de genoma molecular for negativo
- Visitantes assintomáticos de zonas endémicas – suspensão durante seis meses depois de abandonar a zona endémica, a menos que o teste imunológico ou de genoma seja negativo
- Indivíduos com antecedentes de afecção febril não diagnosticada durante uma visita a uma zona endémica ou seis meses após essa visita – três anos depois do desaparecimento dos sintomas; o período de suspensão pode ser reduzido para quatro meses se o teste imunológico ou de genoma molecular for negativo.

Actualmente está em vigor no Instituto Português do Sangue e da Transplantação uma norma de serviço com data de 15 de Abril de 2012 que tem as seguintes indicações:

1.Indivíduos que viveram numa zona endémica com malária durante os primeiros cinco anos de vida: suspensão por três após o regresso da última visita a uma zona

endémica, desde que assintomático, o período de suspensão pode ser reduzido para quatro meses se o teste imunológico a cada dádiva for negativo

2.Individuos com antecedentes de malária: suspensão da dádiva de sangue durante três anos após cessação do tratamento e ausência de sintomas. Aceite posteriormente apenas se o teste imunológico for negativo.

3.Visitante assintomáticos de zonas endémicas: suspensão durante 12 meses depois de abandonar a zona endémica, a menos que o teste imunológico seja negativo.

4.Individuos com antecedentes de afecção febril não diagnosticada durante uma visita a uma zona endémica ou durante seis meses após essa visita: suspensão por três anos depois do desaparecimento dos sintomas, o período de suspensão pode ser reduzido para quatro meses se o teste imunológico for negativo.

Posteriormente foi emitida, pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação, uma circular normativa N°001/CN-IPST, IP/12, com as seguintes medidas de reforço da triagem clinica a dadores, no que diz respeito à malária:

- Visitantes assintomáticos: suspensão temporária da dádiva de sangue por um período de seis meses, a menos que o teste imunológico seja negativo.
- Indivíduos com antecedentes de afecção febril, não diagnosticada, durante ou até seis meses após a visita a esta zona: suspensão temporária da dádiva de sangue por um período de três anos. Este período pode ser reduzido para quatro meses se o teste imunológico for negativo.
- Residentes: suspensão temporária da dádiva de sangue de todos os residentes assintomáticos desta região, por um período de três anos. Este período pode ser reduzido para quatro meses se o teste imunológico for negativo.

A diferença entre estas duas circulares emitidas, pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação, foi a diminuição de um ano para seis meses a suspensão dos visitantes assintomáticos, a menos que apresente um teste imunológico negativo.

Nos Estados Unidos da América são diagnosticados aproximadamente 1500 casos de malária importada por ano. Os critérios para seleção de dadores aplicados implicam uma suspensão por um ano se foi visitante a uma zona endémica e suspensão por três anos se foi residente ou se teve história de malária.<sup>93</sup>

Em França são diagnosticados anualmente cerca de 7500 casos de malária importada. Em 2005, 80% dos casos importados proveio de África, 10% da Ásia e 1% da Guiana Francesa. Dadores com história de malária são excluídos, mas dadores que provêm de zonas endémicas e são assintomáticos são suspensos por quatro meses e depois sujeitos a um teste de pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium* por imunofluorescência e se negativo, são aceites como dadores.<sup>46,47</sup>

Critérios semelhantes são aplicados em países como Reino Unido, Itália e Austrália.

O Brasil é um país que tem zonas endémicas de malária e zonas onde não há transmissão. Os dadores provenientes de zonas endémicas são sujeitos a um teste de pesquisa de anticorpos do parasita, nas zonas não endémicas os viajantes regressados de zonas endémicas ficam suspensos seis meses se forem assintomáticos, se tiverem sido residentes ou viajantes sintomáticos ficam suspensos durante três anos.<sup>66</sup>

Em todos os países é feita uma triagem clínica onde são identificados os dadores que são considerados de risco para a transmissão da malária. É feito um questionário anamnético para avaliara o risco: localização geográfica da estadia, duração da estadia em zona endémica, período de tempo desde a última permanência em zona endémica, história de malária / profilaxia.

*Plasmodium* spp pode ser transmitido através da transfusão sanguínea porque consegue sobreviver aproximadamente 20 dias a 4°C, que são as condições usadas nos bancos de sangue para fazer o armazenamento dos concentrados de eritrócitos.<sup>47</sup> As tabelas 3, 4 e 5 resumem os critérios de selecção de dadores em alguns países.<sup>82</sup>

**Tabela 3:** Período de suspensão de indivíduos autóctones, provenientes de zonas endémicas, em diferentes países.

<b>Irlanda</b>	<b>Permanente</b>
<b>França</b>	4 meses + teste de anticorpos negativo
<b>Estónia</b>	3 anos
<b>Itália</b>	3 anos
<b>Espanha</b>	3 anos
<b>Canadá</b>	3 anos
<b>EUA</b>	3 anos
<b>Brasil</b>	3 anos

Fonte: Reesink, 2005.<sup>43</sup>

Em França, entre 1960 e 1989 foram identificados 120 casos de malária transmitida por transfusão (aproximadamente 5 por ano). Após esta data há apenas ocorrências esporádicas, um caso em 1990 e outro em 1993, um caso em 1998 que foi suspeito e dois casos recentes em 2002 e 2006. Durante o período de 1999 a 2006 houve um caso em cada três anos o que representa um risco estimado de  $7,5 \times 10^{-6}$ .<sup>47</sup>

**Tabela 4:** Período de suspensão de viajantes para áreas endémicas, em função da duração da viagem.

	<b>Duração da estadia na área endémica</b>	
	< 6 meses	≥ 6 meses
<b>Irlanda</b>	12	Permanente
<b>França</b>	4 + teste de ac. negativo	4 + teste de ac. Negativo
<b>Estónia</b>	6	6
<b>Itália</b>	6	6
<b>Espanha</b>	6	6

Fonte: Reesink, 2005.<sup>82</sup>

**Tabela 5:** Países onde é aplicado um teste de screening de anticorpos do parasita para triagem de doadores de sangue.<sup>82</sup>

	<b>Todos os doadores</b>	<b>Dadores com estadia em zona endémica</b>
<b>Irlanda</b>	-	Sim
<b>França</b>	-	Sim
<b>Estónia</b>	-	Sim
<b>Itália</b>	-	Sim
<b>Espanha</b>	Sim	Sim
<b>Israel</b>	-	-
<b>Tunisia</b>	-	-
<b>Japão</b>	-	Sim
<b>Canada</b>	Sim	Sim
<b>Brasil</b>	Sim	Sim

Fonte: Reesink, 2005.<sup>82</sup>

Nos EUA o risco de transmissão de malária por transfusão diminuiu significativamente, passou de 1 a 1,5 casos por 10<sup>6</sup> unidades de sangue transfundidas (entre 1960 e 1970) para 0,1 casos por 10<sup>6</sup> unidades transfundidas (entre 1990 e 2005). Há registos que o maior período de tempo entre a permanência em zona endémica e a transmissão de malária é: 5 anos para *P. falciparum*, 2,5 para *P. vivax*, 7 anos para *P. ovale* e 44 anos para *P. malariae*. No Reino Unido, um caso recente de transmissão de *P. falciparum* envolveu dador semi-imune que tinha estado em zona endémica 8 anos antes da doação de sangue.<sup>58</sup> Em relação a Portugal não há dados conhecidos sobre casos de malária pós-transfusional.

### **1.10. Imunopatologia da malária humana**

O ciclo eritrocitário é a única fase do ciclo de vida do *Plasmodium* que é responsável pelas manifestações clínicas da doença. As manifestações podem ser classificadas como

complicadas ou não complicadas, de acordo com os critérios da OMS.<sup>104</sup> As manifestações clínicas da malária dependem do estado imunológico do doente, do estágio da infecção e da espécie do parasita.<sup>104</sup>

Os mecanismos de imunidade inata ou adquirida podem limitar o pico de parasitemia, prevenindo uma patologia mais severa e reduzindo a circulação das células infectadas. A imunidade inata funciona de forma a limitar ao máximo, a densidade parasitária, mas gradualmente a imunidade adaptativa é requerida para a eliminação completa dos parasitas.<sup>67</sup>

A infecção é iniciada quando os esporozoítos são inoculados na corrente sanguínea pela fêmea do mosquito do género *Anopheles*. Os esporozoítos rapidamente desaparecem da circulação e invadem as células parenquimatosas do fígado. Nos hepatócitos, os esporozoítos desenvolvem-se por um processo de múltiplas divisões denominado esquizogonia, em merozoítos. Uma a duas semanas após a infecções, os hepatócitos rebentam libertando milhares de merozoítos iniciando assim a fase eritrocitária do ciclo. Os merozoítos invadem os eritrócitos por um processo que envolve múltiplas interações entre ligante-receptor, tais como a ligação da proteína EBA-175 do *P. falciparum* á glicoforina A dos eritrócitos. Os merozoítos desenvolvem-se sequencialmente em formas de anel, trofozoítos e esquizontes e cada uma destas formas expressa antigénios únicos.<sup>1</sup>

Nas regiões endémicas, os indivíduos que atingem a idade adulta, raramente apresentam sintomatologia aguda severa, é comum encontrar indivíduos com parasitemia e sem manifestações clínicas. Isto deve-se á constante estimulação do sistema imunitário, resultado do contacto permanente com o parasita.<sup>84</sup>

Contrariamente a estes indivíduos, a malária é bastante preocupante em regiões em que a doença tem um carácter sazonal, atingindo todos os grupos etários e com sintomatologia bastante mais severa.

Na malária não complicada, os sintomas comuns podem ser facilmente confundidos com uma simples gripe (febre, geralmente precedida de sintomas inespecíficos como mal-estar, dores de cabeça, tosse, diarreia, dores nas articulações, náuseas).<sup>99</sup> Estes sintomas normalmente surgem cerca de sete dias após a picada. O aspecto clínico distintivo é designado de acesso palustre ou paroxismo. Neste distinguem-se duas fases: uma de frio, onde o frio que se sente é intenso e treme descontroladamente podendo durar alguns minutos ou horas; a outra fase é de calor, com febre alta (40°C ou mais) corresponde ao rebentamento dos eritrócitos. Após a fase inicial a febre assume carácter intermitente, dependendo do tempo de duração dos ciclos eritrocitário, 48 horas para *P. falciparum*, *vivax* e *ovale*, e 72 horas para *P. malariae*.<sup>99</sup>

Na malária complicada ou grave (causada por *P. falciparum*) podem ser encontradas hiperparasitémias, anemias graves, distúrbios hidroelectrolíticos e de equilíbrio ácido-base, distúrbios hemorrágicos, edema pulmonar, icterícia acentuada, insuficiência renal aguda, hipoglicémia, disfunção hepática, coma, convulsões e choque circulatório.<sup>2</sup>

A malária cerebral é frequente nas infecções causadas por *P. falciparum* e tem sido atribuída, em parte, à capacidade única desta espécie fazer citoaderência, fazendo com que os eritrócitos adiram aos vasos e capilares sanguíneos, causando obstrução á circulação do sangue no cérebro, levando ao coma e a outros fenómenos neurológicos, como convulsões, pressão intracraniana elevada.<sup>87</sup> Uma hipótese sugere que citocinas pró-inflamatórias, como o factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) induz no endotélio cerebral a expressão de ICAM-1, na malária cerebral os vasos têm a expressão aumentada de ICAM-1. Observações têm sugerido que

citocinas pró-inflamatórias, como o TNF $\alpha$  e NO induzidos pelo parasita também contribuem para a patogénese da malária cerebral.<sup>68</sup> Outra citocina presente é o óxido nítrico (NO), embora tenha sido proposto como uma das causas da malária cerebral, o NO está em maior concentração na malária não complicada. Na malária grave, o coma deve ser causado pelo aumento da concentração de NO a nível cerebral e não sanguíneo, mas tal não foi testado.<sup>71</sup> Na verdade, os níveis de nitrato total e nitrito presentes no líquido cefalorraquidiano de crianças com malária cerebral são baixos, foi sugerido que isso pode exacerbar a N-metil-D-aspartato (NMDA) mediada por neurotoxicidade como o ácido quinolinico.<sup>71</sup>

O desenvolvimento de imunidade à malária é um processo complexo, depende da idade do indivíduo, não se desenvolve em indivíduos com fraca exposição ao parasita e pode ser perdida, especialmente quando os indivíduos imunes deixam as zonas endémicas.<sup>50</sup> Indivíduos adultos depois de vários anos de exposição, atingem uma resistência relativa e desenvolvem imunidade efectiva que controla a parasitémia e previne complicações graves.<sup>11,13,33,38,65,80</sup>

O mecanismo exacto através do qual se adquire imunidade à malária continua a ser objecto de discussão. O complexo ciclo de vida do parasita, que envolve dois hospedeiros diferentes e com diferentes fases torna-o muito complexo. Mas acredita-se estar envolvida resposta imunológica mediada por células e resposta humoral.

Os macrófagos, os neutrófilos, as células dendríticas e as células *natural killer* (NK) parecem ter um papel fundamental para a resposta inata do sistema imunológico, nos humanos, durante uma fase inicial da infecção.<sup>108</sup> Os protozoários ou os antígenos por eles produzidos vão ligar-se a receptores presentes na superfície das células do sistema imune que podem ser do tipo CD39 ou TRL (Toll-like Receptor). As células dendríticas, os macrófagos e os

neutrófilos vão produzir citocinas IL-12 quando activados. Estas citocinas vão induzir a produção de interferão  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) por parte das células NK e há activação de mecanismos efectores microbicidas por parte dos macrófagos.<sup>71,108</sup>

As células NK reconhecem antígenos de superfície dos eritrócitos infectados permitindo assim a destruição destas células. As células NK no processo de interacção com as células infectadas libertam quimiocinas e citocinas, entre as quais INF $\gamma$ , que é responsável pela activação dos macrófagos. A capacidade citotóxica destas células pode ser aumentada pela acção da interleucina-2 (IL-2) e o INF- $\gamma$  produzido por outras células, nomeadamente os NK ou linfócitos T.<sup>71</sup>

Anticorpos contra proteínas de superfície do esporozoítio podem ter um papel importante através da opsonização, levando á depuração antes da chegada aos hepatócitos, ou através da interferência com o processo de invasão dos hepatócitos.<sup>70</sup> Tanto as células T CD8<sup>+</sup> como as T CD4<sup>+</sup> estão envolvidas na imunidade protectora contra a malária, mas em diferentes fases. Em modelos animais, as células T CD8<sup>+</sup> têm sido implicadas com principais células efectoras, as células T CD4<sup>+</sup> secretoras da interleucina-4(IL-4) são requeridas por indução em resposta ás células TCD8<sup>+</sup>, e as células CD4<sup>+</sup> Th1 ajudam a actividade efectora óptima das células T CD8<sup>+</sup>. As células T $\gamma\delta$ , células NK e NKT também têm um papel activo.<sup>34</sup>

As células T CD4<sup>+</sup> têm um papel crucial na imunidade contra a fase eritrocitária, produzem citocinas que estão envolvidas na activação da imunidade inata e ajudam as células B activadas a produzirem anticorpos essenciais para eliminação do parasita. A protecção da fase eritrocitaria é mediada por anticorpos, mas também são usados outros mecanismos protectores incluindo a imunidade inata, INF $\gamma$  e as células CD4<sup>+</sup>.<sup>79,95</sup>

A imunidade inata na malária compreende a participação de moléculas do sistema de complemento, activação dos macrófagos, células NK e NKT. As moléculas do sistema de complemento causam a lise directa do parasita, os macrófagos fagocitam os parasitas livres e os eritrócitos parasitados, e os NK e NKT induzem a lise das células parasitadas. Para além destas células, as células dendríticas também participam no início da resposta imune adquirida<sup>41</sup> São as células dendríticas que fazem a eficiente deteção dos parasitas em resposta á ligação directa do antígeno produzidos pelo parasita, ao PRR do tipo CD36 ou TLR, ou ainda , á ligação de citocinas do tipo INF- $\gamma$ , as células dendríticas maturam e migram para o baço, local primário da resposta imune na fase sanguínea.

Mecanismos de resposta inata ou adaptativa podem limitar a parasitémia e prevenir malária severa, contudo não eliminam a infecção completamente, podendo ocorrer parasitémia submicroscópicas que podem persistir por meses ou anos.<sup>96</sup>

A imunidade inata engloba mecanismos de resistência que ocorrem logo no início da infecção, antecedendo a resposta adaptativa. Exemplos dessa resposta inata são casos de anemia falciforme, que impede a evolução do *P. falciparum* para malária severa,<sup>3</sup> deficiência em glicose-6-fosfato-desidrogenase, que stress oxidativo no eritrócito o que dificulta a replicação do parasita.<sup>69</sup> Esta imunidade inata também pode ser demonstrada em indivíduos que não expressam o antígeno Duffy nos eritrócitos, o que confere resistência ao *P. vivax*,<sup>3</sup> pela ausência de interacção entre o antígeno com a proteína expressa no parasita.<sup>39</sup> As hemoglobinopatias HbS, HbE, HbC que apresentam substituição do ácido glutâmico por valina ou por lisina, também conferem resistência à malária ou à malária severa.<sup>64,84</sup>

O INF- $\gamma$  produzido pelas células T CD4<sup>+</sup> em resposta aos antígenos específicos da fase eritrocitária, também estão associados á protecção contra uma re-infecção. O INF- $\gamma$  liberado

pelas T CD4<sup>+</sup> também ajuda na indução da produção de anticorpos IgG específicos citofílicos da fase eritrocitária e também ajuda na depuração dos eritrócitos infectados.<sup>15</sup>

O papel das células B na imunidade contra a malária foi estudado em ratinhos com ausência de células B, os quais eram incapazes de eliminar a infecção correspondente á fase eritrocitária.<sup>100</sup> Outro estudo demonstrou que as células B não são necessárias no início da parasitemia, mas parecem ser importantes na fase final da infecção, provavelmente pela produção de anticorpos específicos contra o parasita.<sup>101</sup>

Os linfócitos T *naive* e os linfócitos B migram do timo e da medula óssea, respectivamente, para a periferia e órgãos linfoides secundários, onde os linfócitos T vão ser activados e migrar para os focos inflamatórios. Os linfócitos T auxiliares específicos de determinado antígeno, quando forem activados sofrem um processo de expansão clonal nos tecidos linfoides secundários e acabam por entrar em circulação, onde a partir do sangue periférico migram para os focos inflamatórios. A maturação das células dendríticas está associada com o aumento da regulação da expressão da molécula MHC classe II (CD40, CD80, CD86) e ao aumento da IL-12. A IL-12 activa as células NK que produzem de INF- $\gamma$ , que por sua vez induzem a diferenciação das células T naive em CD4<sup>+</sup> para um fenótipo Th1, que por sua vez leva á produção IL-2. O IL-2 vai activar as NK par a produção de INF- $\gamma$  que leva novamente á maturação das células dendríticas e dos macrófagos, ampliando a resposta imune.<sup>71</sup>

O sistema de complemento é um elo de ligação importante entre o processo inflamatório inicial e os mecanismos imunológicos adaptativos porque coopera com mecanismos celulares e humorais que leva á formação dos anticorpos. Os anticorpos específicos contra os antígeno parasitários são da classe IgG e subclasse IgG1 e IgG3, que vão actuar na opsonização dos eritrócitos infectados e facilitar a sua fagocitose.<sup>78</sup>

Os anticorpos podem proteger contra a malária através de diferentes meios: inibem a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, inibem o crescimento intra-eritrocitário e promovem a eliminação no baço dos eritrócitos infectados. A opsonização dos eritrócitos infectados aumenta significativamente a susceptibilidade á fagocitoses e citotoxicidade por parte dos neutrófilos, monócitos e macrófagos.<sup>44,71</sup>

A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é um passo fundamental no estabelecimento da infecção, e portanto, é provável que seja um alvo importante da resposta imune protectora.<sup>70</sup>

O processo envolve uma complexa cascata de eventos envolvendo interacções entre os eritrócitos e as proteínas do parasita, incluindo as proteínas de superfície do merozoito (MSP1 a 11) as de superfície do eritrócito, as do vacúolo parasitóforo entre outras.<sup>70</sup>

Devido á limitada exposição destas proteínas ao sistema imune dos hospedeiro, é provável serem os anticorpos a principal forma de imunidade contra os merozoítos.

A importância dos anticorpos na imunidade protectora contra infecções causadas por *P. falciparum* foi estudada através da transferência passiva das imunoglobulinas contribuiu para o controlo da densidade parasitaria e protecção contra a infecção.<sup>22</sup> Num estudo semelhante a gama globulina de adultos da África ocidental foi administrada a indivíduos do leste africano com graves infecções por *P. falciparum* o levou á redução da parasitémia e recuperação clinica.<sup>88</sup> Em pacientes tailandeses, o efeito protector de anticorpos IgG africanos contra *P. falciparum* foi demonstrado por transferência passiva.<sup>67, 78</sup>

Nas regiões endémicas a imunidade natural contra o *Plasmodium* é adquirida de forma lenta, requiere exposições repetidas prolongadas ao parasita. Esta imunidade reduz o risco de crises severas de malária, mas não impede a existência de parasitémia. Os mecanismos de defesa que estão envolvidos são imunidade humoral – anticorpos e imunidade celular. É evidente que

os anticorpos têm um papel muito importante na redução da parasitemia e na diminuição dos sintomas clínicos, como foi demonstrado pela administração de imunoglobulina IgG de soros de hiperimunes.<sup>78,84</sup>

A cooperação entre os anticorpos e os monócitos parecer ser crucial para a aquisição da imunidade protectora. Os anticorpos produzidos em resposta á infecção são de particular importância, anticorpos denominados citofílicos podem cooperar com os monócitos por via Fc $\gamma$ RI e Fc $\gamma$ RII receptores de opsonização e fagocitose ou participar na inibição celular mediada por anticorpos e também em na citotoxicidade celular mediada por anticorpos.<sup>67</sup> Protecção contra a fase sanguínea do ciclo do *Plasmodium* depende da proporção de anticorpos citofílicos específicos e a proporção relativa de anticorpos não citofílicos. A predominância de anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 em zonas endémicas está associada a elevados níveis de parasitemia ou risco de ataque de malária. Por outro lado, anticorpos não citofílicos, como IgG4, podem inibir mecanismos efectores por competição com anticorpos citofílicos e ser considerados não protector. IgG2 é não citofílicos, mas pode estar relacionada com protecção em indivíduos com variação alélica nos monócitos Fc $\gamma$ RIIA receptor de ligação da IgG2.<sup>78</sup>

Os níveis IgE estão elevados em indivíduos infectados com malária. Há uma correlação negativa entre os níveis de IgE e a parasitemia placentária e os níveis de plaquetas e hemoglobina. Os valores de IgE são mais elevados no caso de malária cerebral do que no caso de malária não complicada.<sup>67</sup>

Estudos indicam que há uma associação citofílicos da IgG anti-parasita como protecção contra malária. É sugerida a hipótese de que o anticorpo inicial contra os antígenos do parasita é não

protector IgG2/IgG4 e IgM e que gradualmente se transforma em resposta protectora onde domina anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3.<sup>78</sup>

Tem sido demonstrado que a imunidade contra *Plasmodium spp* está associada á aquisição de anticorpos anti-*Plasmodium* de subclasses citofílicos, em particular IgG3. Não foi observado associação protectora com as subclasses não citofílicos IgG4 e IgM.<sup>78</sup> Em relação á IgG2, não há resultados unânimes, em relação aos níveis de anticorpos IgG2 específicos e os episódios clínicos de malária ou resistência á malária. É de salientar que a proteção contra a malária por IgG2 tem sido associada *FcγRIIa-H131* alotipo, mutação de receptor de ligação da IgG2.<sup>10,37,92</sup>

Foi sugerida a hipótese de que o desenvolvimento de uma resposta adequada mediada por IgG anti-*Plasmodium* depende da maturação dos anticorpos respondedores, não só em termos da sua especificidade e afinidade, mas também em termos de classe implicada no desenvolvimento progressivo da imunidade.<sup>78</sup>

A imunidade adquirida contra a malária é altamente prevalente em adultos que residem em zonas endémicas, e desenvolvem uma forte resistência quando são expostos por longos períodos a infecções repetidas. A transferência passiva de IgG purificada de soros hiperimunes para pacientes com malária tem demonstrado que a IgG confere proteção. No entanto os mecanismos que envolvem a aquisição natural de IgG proteção não estão completamente esclarecidos.<sup>67</sup>

Os primeiros anticorpos a aparecer são os chamados não citofílicos (IgG2/IgG4 e IgM) e gradualmente esta resposta vai se transformar em classe citofílica (IgG1 e IgG3). IgG2 é dirigido contra antígenos de elevado peso molecular e IgG1 e IgG3 contra antígeno de baixo peso molecular, mas esta resposta não é precedida da IgG2 correspondente. Isto sugere que a

activação das células B depende da idade e da exposição. Em episódios subsequentes de malária, clones de células B adicionais são activados para gerar a principal resposta IgG1/IgG3 o que contribui para o desenvolvimento da imunidade. A resposta imune a uma ampla gama de antigénios é fraca numa primeira exposição, é provável que o parasita tenha uma actividade supressora do sistema imunitário. No entanto após repetidas exposições um leque alargado de antigénios do parasita vai reagir com os anticorpos desenvolvidos.<sup>67,78</sup>

A incerteza permanece quanto á subclasse de anticorpos IgG mais importante na imunidade protectora contra a malária, no entanto em indivíduos clinicamente protegidos, os anticorpos citofilicos são os mais representativos, e a sua ligação aos eritrócitos infectados resulta na sua opsonização, facilitando a fagocitose pelos monócitos/macrófagos. Potenciais mecanismos têm sido sugeridos, nos quais os anticorpos medeiam a neutralização dos parasitas, incluindo a lise dos eritrócitos infectados mediada pelo complemento, impedindo o processamento de proteínas de invasão ou bloqueando os seus sítios de ligação aos eritrócitos.<sup>108</sup>

Pensa-se que anticorpos inibitórios actuam através da inibição da invasão dos eritrócitos, pela ligação aos antigénios presentes á superfície dos merozoitos. As crianças podem adquirir anticorpos inibitórios desde tenra idade, e esta relação tem sido demonstrada. Os principais mecanismos para a neutralização dos parasitas mediada por anticorpos pensa-se que envolva monócitos e outros leucócitos, como células efectoras, por meio da inibição celular mediada por anticorpos. Os factores solúveis (TNF $\alpha$ , NO) libertados pelos morócitos também ajudam na opsonização dos merozoitos. Os anticorpos, por si só, neutralizam os parasitas pela interferência da invasão dos merozoitos.<sup>71</sup>

### **1.11. Diagnóstico clínico e laboratorial da malária**

O principal objectivo no diagnóstico desta doença é fazê-lo com rapidez, baixos custos, elevada sensibilidade e especificidade. O diagnóstico da malária deve ter em consideração dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. A elevada sensibilidade do diagnóstico em áreas endémicas de malária é particularmente importante para grupos populacionais mais vulneráveis, como crianças e indivíduos não imunes, em que a doença rapidamente pode ser fatal; enquanto que a alta especificidade vai reduzir o uso de tratamentos desnecessários com os antimaláricos e, desta forma, melhorar o diagnóstico de outras afecções febris. Assim um diagnóstico adequado é muito importante para assim se poderem salvar mais pessoas, em menos tempo e com menos recursos.<sup>72</sup>

#### **Microscopia óptica:**

Existem vários métodos de diagnóstico laboratorial. Um destes é métodos é a microscopia óptica: observação do parasita na gota de sangue ou no esfregaço de sangue corado pela técnica de Giemsa, sendo a primeira a mais utilizada porque permite uma maior concentração de parasitas no campo do microscópio.

No método de gota espessa é feita a colheita de sangue por punção distal e a sua distribuição adequada na lâmina de vidro, é realizada a cloração e a leitura ao microscópio. Esta técnica permite a visualização do parasita, identificação da espécie e da fase do seu desenvolvimento, bem como a quantificação. É uma técnica de execução rápida, mas que requer um técnico com muita experiência para a sua leitura porque a morfologia dos parasitas é alterada pela execução da técnica; a distribuição dos parasitas na lâmina é aleatória; é feita a lise dos

eritrócitos e há uma maior concentração de sangue desmembrado numa área relativamente pequena o que aumenta a probabilidade de encontrar parasitas.<sup>5</sup>

O método de coloração do esfregaço permite a identificação da espécie porque há a manutenção das características dos parasitas e dos eritrócitos, mas por outro lado, em baixas parasitemias há uma redução da sensibilidade; a amostra de sangue fica espalhada ao longo da lâmina o que aumenta o número de campos que têm de ser observados no microscópio e não há uma distribuição uniforme dos parasitas, ficam estes localizados mais na cauda do esfregaço. Estas são duas técnicas utilizadas em complementaridade, com custo relativamente baixo, alto grau de sensibilidade e especificidade, permitem a identificação da espécie, quantificação da parasitémia, mas exige pessoal devidamente treinado para que os resultados sejam conseguidos. É considerado como método de referencia para outras técnicas e com as quais devem ser comparadas. Um profissional devidamente treinado consegue obter uma boa sensibilidade 0,001% de parasitémia, ou seja um parasita por  $\mu\text{l}$  de sangue.<sup>51,98</sup>

As grandes vantagens da microscopia são: baixos custos directos, se a infra-estrutura para manter o serviço estiver disponível; alta sensibilidade se a qualidade da microscopia também for elevada; diferenciação entre espécies de *Plasmodium*; determinação da densidade do parasita; capacidade de monitorizar a resposta à terapêutica.<sup>61</sup>

### **Testes Rápidos de Diagnóstico – TRD**

Outro método que pode ser utilizado para o diagnóstico de malária são os Testes Rápidos de Diagnóstico (TRD), são baseados numa técnica de imunocromatografia para a detecção do antígeno do parasita.<sup>61</sup>

A membrana que compõe o kit está impregnada de anticorpos e sobre esta membrana vai ser colocada uma pequena amostra de sangue que irá reagir com os anticorpos da membrana e em caso de positividade aparece uma linha visível no kit.<sup>14,52</sup>

Os TRD não necessitam de grandes investimentos (não necessita de electricidade ou equipamentos específicos), fáceis e rápidos de executar e de fácil interpretação, já existem disponíveis no mercado de diferentes casas comerciais.

Os TRD mais comuns detectam apenas *P. falciparum*, mas também existem outros TRD que distinguem *P. falciparum* das outras espécies. Em 1986 uma proteína rica em histidina, denominada Pf-HRP2, foi identificada no *P. falciparum*. Posteriormente verificou-se a sua presença no plasma de pacientes infectados com *P. falciparum*. A partir 1993, houve um grande desenvolvimento dos métodos imunocromatográficos baseados na captura quantitativa da Pf-HRP2. A desvantagem é a permanência da proteína circulante por tempo prolongado, apresentando resultados positivos indivíduos já tratados.<sup>61</sup>

Mais recentemente foram desenvolvidos métodos de diagnóstico rápido da malária utilizando anticorpos monoclonais e policlonais dirigidos contra a Pf-HRP2 e contra a enzima lactato desidrogenase (pLHD) das quatro espécies de *Plasmodium*. Estes testes têm a vantagem de permitir diferenciar *P. falciparum* das outras espécies identificando como não *P. falciparum*. A pLDH é uma enzima intracelular produzida em abundância pelos parasitas vivos, o que permite diferenciar a fase aguda da convalescência da infecção.<sup>52,97</sup>

Em muitos locais os pacientes são tratados fora dos serviços de saúde formais, por exemplo, na comunidade ou mesmo em casa; onde a microscopia não é viável, mas onde os TRD são possíveis. Embora os TRD sejam mais caros que a microscopia, a sua implementação pode ser consideravelmente rentável em muitos destes exemplos. É um método ainda pouco

sensíveis<sup>21</sup> devido a: diversidade antigénica provoca muitos falsos negativos, persistência de Pf-HRP2 mais de um mês após o fim da infecção tem como consequência falsos positivos, presença de gametócitos leva á ocorrência de falsos positivos, aumento do factor reumatoide também pode levar a falsos positivos. A sensibilidade e especificidade dos testes rápidos são variáveis, a sua vulnerabilidade a altas temperaturas e á humidade são uma desvantagem importante, mas têm a grande vantagem de não requerer um profissional de saúde qualificado nem equipamento especial e em poucos minutos obtém-se o resultado.<sup>5</sup>

No diagnóstico de malária grave, a microscopia torna-se preferencial, não só porque fornece o diagnóstico, mas também avalia outros parâmetros importantes num paciente gravemente doente. Em situações em que o teste rápido foi usado, permite a rápida instituição da terapêutica com antimaláricos, contudo é recomendada a examinação microscópica para melhorar a gestão global do paciente.<sup>109</sup>

### **Testes Serológicos**

Um outro método diferente através do qual se pode fazer o diagnóstico é o teste serológico para detecção de anticorpos contra o parasita da malária. Este método pode ser feito por duas técnicas diferentes: imunofluorescência indirecta (IFA) ou ensaios imunoenzimáticos (EIA).<sup>89,90</sup>

Os testes serológicos não detectam o parasita, mas sim a resposta do sistema imunitário ao parasita que é a produção de anticorpos. Numa primeira fase são do tipo IgG é a primeira imunoglobulina a ser produzida na fase aguda da doença, posteriormente passado alguns dias o organismo começa a responder com a produção de outra imunoglobulina como é o caso da

IgM e outras. A presença de anticorpos entra em declínio passado aproximadamente um mês após o início da infecção e persiste alguns meses ou anos.<sup>8</sup>

Testes serológicos IFA (*Immuno Fluorescence Antibody Assay*) permitem a detecção de anticorpos produzidos duas semanas após a infecção, do tipo IgG e IgM contra estádios sanguíneos assexuados, persistem 3 a 6 meses após a eliminação da parasitemia. Para a sua realização é necessário uma lâmina coberta de antígeno total. É colocado a reagir o soro ou plasma do paciente com os antígenos da lamina, se existirem anticorpos contra esse antígeno ocorre uma ligação, mas para tornar essa ligação visível é necessário adicionar um anticorpo marcado com fluorescência, contra o anticorpo do paciente que está ligado. Para a leitura destes resultados é necessário um microscópio de fluorescência, se for visível fluorescência na lamina é porque o resultado é positivo. Esta é uma técnica morosa, de difícil interpretação, exige técnicos experientes, é impossível de automatizar e não há padronização dos reagentes. Mas é uma técnica sensível e específica.<sup>31</sup>

Testes serológicos EIA (*Enzyme Immunosorbent Assay*) permitem a detecção de anticorpos produzidos duas semanas após a infecção, do tipo IgG, IgM e IgA contra estádios sanguíneos assexuados, persistem 3 a 6 meses após a eliminação da parasitemia. Para a realização é necessário uma placa que tem os antígenos imobilizados por adsorção. É colocado a reagir o soro ou plasma do paciente com os antígenos da placa, se existir anticorpos contra esses antígenos ocorre uma ligação que não é visível. Para permitir a visualização da reação terá que ser adicionado um segundo anticorpo marcado com uma enzima, contra o anticorpo do paciente e posteriormente adicionar um substrato ao complexo antígeno-anticorpo-enzima e daí resultar um produto colorido, passível de ser quantificado. Esta técnica permite testar um grande número de amostras ao mesmo tempo, é mais reprodutiva e de fácil automatização, há reagentes padronizados e comercialização de kits. É uma técnica sensível e específica.<sup>31,59,90</sup>

## **Técnicas de Biologia Molecular**

O diagnóstico de malária baseado na detecção de ácidos nucleicos, mostrou um grande progresso em termos de eficácia com o desenvolvimento da tecnologia de amplificação do DNA de *Plasmodium* spp usando a reacção em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*). A técnica consiste na amplificação de uma ou várias sequencias de DNA parasitário, se existir uma quantidade muito pequena de parasita na amostra a ser estudada a amplificação ocorre e é feita a detecção. Para a execução desta técnica é necessário material dispendioso (como por exemplo *primers*, nucleótidos, termocicladores), requer técnicos qualificados e com experiencia, é uma técnica complexa.<sup>51</sup>

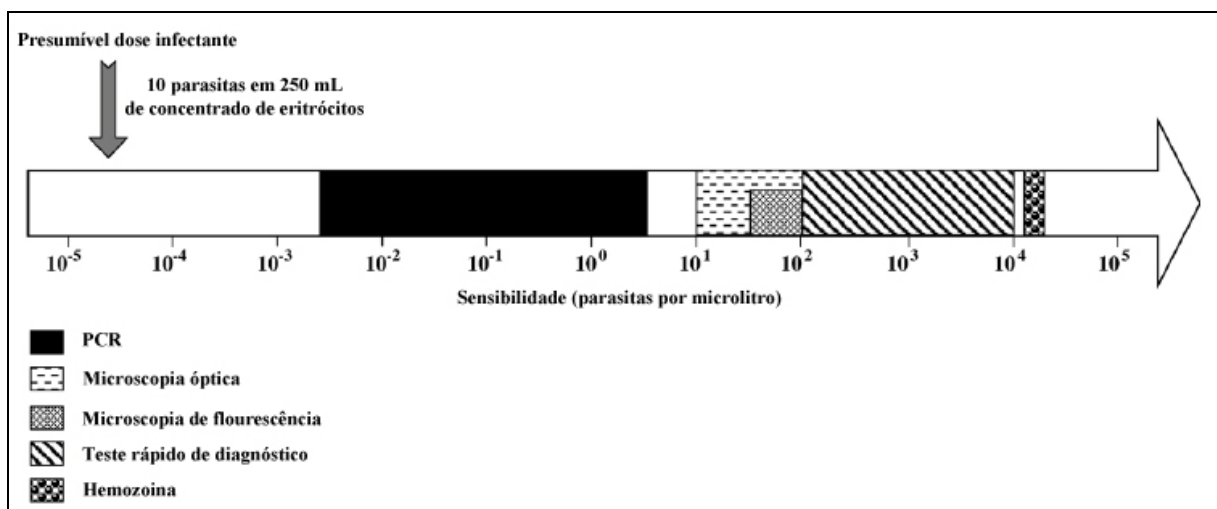
Embora seja uma técnica mais sensível que a microscopia óptica, os resultados não estão disponíveis com rapidez suficiente para o estabelecimento de um diagnostico, em virtude do custo elevado, reagentes necessários e alta complexidade técnica, faz com que o diagnóstico de malária através de PCR seja restrito aos grandes laboratórios. Esta técnica de diagnóstico é útil para confirmar a espécie do parasita, mas também possibilita a quantificação da carga parasitária importante para a monitorização da terapêutica.<sup>90</sup>

## **Quantitative Buffy Coat - QBC**

Outra técnica que pode ser aplicada ao diagnostico QBC (*Quantitative Buffy Coat*) consiste na coloração do DNA parasitário com um corante fluorescente (por exemplo laranja de acridina), seguido de centrifugação das amostras em tubos de micro-hematócrito o que permite a concentração dos parasitas. A detecção é feita por microscopia de fluorescência. É um método que apresenta elevada sensibilidade para *P. falciparum* e é de execução simples, apresenta

baixa especificidade (corante também se liga ao DNA dos leucócitos), não identifica espécies (baixa sensibilidade para outras espécies), não permite quantificação, existem microscópios fluorescentes portáteis e laminais pré-preparadas com fluoróforos disponíveis no mercado, mas é mais dispendioso que a microscopia óptica.<sup>5</sup>

Segundo Seed 2005,<sup>91</sup> comparação da sensibilidade de diferentes métodos de diagnóstico directo de malária em banco de sangue. (Figura 3)



**Figura 3:** Sensibilidade dos testes directos de diagnóstico de malária. Adaptado de Seed 2005.<sup>91</sup>

## II. OBJECTIVOS

### **2.1. Objectivos do estudo**

1-Determinar a prevalência de anticorpos anti-*Plasmodium* em indivíduos que viajaram ou regressaram de zonas endémicas.

2-Relacionar a presença de anticorpos com variáveis sociodemográficas, variáveis de caracterização da viagem/estadia e história de malária.

3-Characterizar a diferença de taxas de aprovação de dadores, entre a utilização de um teste imunológico e a triagem baseada em critérios clínicos, caso o grupo estudado pretendesse ser dador de sangue.

4-Characterizar conhecimentos, atitudes e práticas sobre a malária e sua prevenção na população em estudo

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Tipo de estudo**

Neste trabalho foi realizado um estudo qualitativo, descritivo, exploratório e transversal, contendo também uma componente analítica a fim de testar associações/diferenças entre variáveis.

#### **3.2. População e amostra**

A população alvo deste estudo é constituída por indivíduos com estadia(s) em zona endémica de malária (viajantes ou residentes).

Utilizou-se uma técnica de amostragem não aleatória, amostragem por conveniência (ou acidental) e amostragem por redes.

Para se obter esta amostra foi solicitada a colaboração da clínica médica MEDICIL e de grupos de voluntariado/missionários.

Na clínica médica MEDICIL eram abordados os utentes para saber se preenchiam os critérios para colaborar no estudo e caso reunissem os critérios era-lhes solicitada a colaboração. Em relação aos grupos de voluntários/missionários foi agendado previamente com os grupos uma data para ser efectuada a colheita e preenchimento dos questionários aos elementos que reunissem os critérios.

Os critérios de inclusão no estudo foram:

- Ter pelo menos uma estadia em zona endémica de malária, independentemente do motivo da estadia, da sua duração e da data em que decorreu essa estadia

- Ter idade igual ou superior a 18 anos
- Não apresentar sintomas de malária, indivíduo considerado saudável
- Estar informado acerca do estudo e aceitar participar, preenchendo o consentimento informado
- Fornecer o seu contacto e-mail e/ou telefónico para posterior contacto

Foram retirados do estudo indivíduos com estadias em países com zonas endémicas e/ou transmissão sazonal quando não era explícito se o indivíduo tinha estado numa região endémica durante a época de possível contágio ou fora dessa época, (por exemplo Cabo Verde, Perú). O estudo decorreu entre Setembro de 2010 e Janeiro de 2011.

Inicialmente foram abordados os possíveis participantes no estudo para saber se preenchiam os critérios para inclusão. De seguida era explicado o objectivo deste estudo e o procedimento, e era também informado que se o resultado do PCR fosse positivo seria contactado e encaminhado para uma consulta no Instituto de Higiene e Medicina Tropical .

Aos indivíduos que aceitam participar no estudo é-lhes entregue um questionário, que lê e preenchem. O questionário é separado do consentimento informado para assim ser assegurada a confidencialidade dos participantes. Por fim é-lhes retirada uma amostra de sangue para posterior processamento.

### **3.3. Instrumento de recolha de dados**

A cada participante foi aplicado um questionário auto preenchido para colheita de dados sociodemográficos e de dados relacionados com as características de viagens/estadias em zonas endémicas de malária e história de malária.

Na elaboração do questionário foram tidos em consideração alguns aspectos:

- Foram utilizadas perguntas fechadas, de escolha única ou múltiplas, e perguntas abertas.
- Algumas respostas foram dadas em escalas nominais, em escalas ordinais ou em escalas de rácio.
- Na redacção das perguntas foi utilizada uma linguagem simples e adequada ao vocabulário dos respondentes.
- As perguntas sensíveis, que permitem a caracterização sociodemográfica do respondente, foram colocadas no final.

O questionário aplicado era anónimo.

Antes do início do estudo foi efectuado um pré-teste ao questionário, que consistiu na aplicação de 30 questionários a utentes da clinica médica MEDICIL que reuniam os critérios para inclusão no estudo. Posteriormente foram efectuadas algumas alterações ao questionário conforme os resultados do pré-teste

A aplicação do questionário e da colheita de amostras de sangue foram feitas pela investigadora e por dois técnicos de Análises Clínicas da MEDICIL, cada técnico tinha uma listas dos países situados em zona endémica de malária.

### **3.4. Processamento e armazenamento das amostras**

Foi feita uma punção venosa para a recolha de 3ml de sangue total para o tubo de EDTA e uma gota de sangue total para o papel de filtro.

O papel de filtro com a gota de sangue total foi deixado a secar e posteriormente colocado dentro de um saco de plástico para ser guardado á temperatura ambiente em local seco.

O tubo de EDTA com o sangue total foi centrifugado de imediato, o plasma sobrenadante separado para um ependorf devidamente identificado e congelado a temperaturas inferiores a -20°C.

### **3.5. Determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp**

Para discriminar os indivíduos com anticorpos anti-*Plasmodium* spp, dos que não têm anticorpos ou são indeterminados utilizou-se um kit de ELISA comercial, teste EIA Malária. Este teste permite uma detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. O kit utiliza quatro antigénios recombinantes, os antigénios detectarão IgG, IgM e IgA específico de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, permitindo detectar anticorpos durante todas as fases da infecção. Todos os reagentes, excepto o conjugado e a solução de lavagem são fornecidos prontos a utilizar e codificados por cores, e o procedimento utiliza amostras não diluídas e volumes normais para facilitar a utilização manual e automática.<sup>53</sup>

Adicionaram-se 50µl/pço das amostras de plasma não diluídas, bem como dos controlos negativos e positivos. Incubou-se a placa durante 30 minutos a 37°C com agitação orbital. De seguida, lavou-se a placa cinco vezes com 100 µl/pço de tampão de lavagem e incubou -se a placa com o 50µl/pço de conjugado diluído 1:10 (v/v) em tampão de conjugado durante 30

minutos a 37°C com agitação orbital. Após os 30 minutos, lavou-se a placa cinco vezes com 100 µl/pço de tampão de lavagem. Adicionou-se 50 µl/pço de substrato/cromogénio e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos. Como o substrato é fotossensível, a placa é incubada, durante esses 30 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação com o substrato, adicionaram-se 50 µl/pço de solução de *STOP* (ácido sulfúrico 0,5M). A leitura dos resultados foi feita num leitor de microplacas a 450 nm.

O valor de *cut-off*, de acordo com as instruções do kit é calculado da seguinte forma:<sup>53</sup>

$$\text{(Controlo negativo 1 + CN 2 + CN 3) / 3 + 0,100}$$

O critério de validação do ensaio é o seguinte: a leitura da absorvância a 450nm de cada controlo negativo deve ser inferior ou igual a 0,080 e para o controlo positivo superior ou igual a 1000.

Interpretação: amostras com valor de absorvância inferior ao valor de *cut-off* são consideradas negativas MALARIA EIA TEST KIT. Amostras cujo valor de absorvância é 10% abaixo do valor de *cut-off*, devem ser interpretadas com cuidado. Deve-se repetir o procedimento em duplicado. Amostras com valor de absorvância superior aos valores de *cut-off* são consideradas positivas pelo MALARIA EIA TEST KIT.<sup>53</sup>

Relativamente à especificidade e sensibilidade do teste serológico utilizado neste estudo, segundo as informações técnicas do kit (MALARIA EIA TEST KIT, Bio-Rad), este apresenta uma especificidade de 96,21% (dados externos provenientes de 13608 amostras de dadores considerados em risco de infecção de malária), 92,5% de sensibilidade para *P. falciparum*, 100% de sensibilidade para *P. vivax*, 80% e 67% de sensibilidade para *P. ovale* e *P. malariae* (pequeno numero de amostras estudadas).<sup>53</sup>

### **3.6. Polymerase Chain Reaction (PCR) para identificação de *Plasmodium* spp e *Plasmodium falciparum***

Amostras de sangue de cada paciente foram impregnadas em papel de filtro (Whatman™, GE Healthcare – UK). DNA genômico de cada amostra de sangue foi purificado através do kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen – EUA). De seguida, as amostras foram submetidas a um ensaio de *nested PCR* (*Polymerase Chain Reaction*), de acordo com as condições de reação apresentadas na tabela6. Na primeira reação de amplificação o par de *primers* utilizados apresentam especificidade para a sequência ribossomal específica para o género *Plasmodium* spp. Na segunda reação de PCR, a utilizar uma alíquota da reação anterior como *template*, quatro pares de *primers*, específicos para uma das quatro espécies de *Plasmodium* spp, foram utilizados. As sequências de cada *primers* e os produtos de amplificação de cada reação são apresentados na tabela7.

A mistura da reação de PCR foi submetida ao termociclador (MJ Mini Gradiente Thermal Cycler, Bio-Rad – EUA), de acordo com as seguintes condições: (1) desnaturação (94°C por dois minutos); (2) etapa adicional de desnaturação (94°C por trinta segundos); (3) *annealing* (55°C por um minuto e trinta segundos); (4) extensão (72°C por dois minutos); (5) final da reação (4°C). Cada ciclo foi repetido 40 vezes. A seguir, a amplificação das sequências de interesse foram analisadas em eletroforese em gel de agarose a 2% (v/v).

**Tabela 6:** Condições de reação da *nested PCR* utilizada para amplificar sequências específicas de *Plasmodium* spp em amostras de sangue.

Constituintes (Bioline – UK)	Concentração	Volumes (µl)
Amostra de DNA genômico	-	3,0
<i>NH<sub>4</sub> buffer</i>	10x	5,0
Cloreto de Magnésio	50 mM	3,0
Mistura de dNTPs	100 mM	1,0
<i>Primers (sense e anti-sense)</i>	100 pmol/µl	1,0 cada
Enzima Taq polimerase	5 u/ µl	0,5
Água	q.b.p	50,0

**Tabela 7:** Sequências nucleotídicas (*primers*) utilizadas na *nested PCR* específicas para as espécies de *Plasmodium* spp.

Sequências dos <i>primers</i> *	Especificidade	Produto Amplificado
5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3' 5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3'	<i>Plasmodium</i> spp	1.200 pb
5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3' 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'	<i>P. falciparum</i>	205 pb
5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC-3' 5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA-3'	<i>P. malariae</i>	144 pb
5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3'	<i>P. vivax</i>	120 pb
5'-ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGAGA-3' 5'-GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG-3'	<i>P. ovale</i>	800 pb

### **3.7. Metodologia estatística**

O tratamento dos dados foi feito através do programa Predictive Analytics Software (PASW Statistics) versão 19.

Adoptou-se o nível de significância de 5% para a probabilidade máxima de erro na rejeição da hipótese nula, quando esta hipótese é verdadeira. Considerou-se a existência de diferenças significativas sempre que  $p < 0.05$ .

Na metodologia estatística foram utilizadas as seguintes técnicas:

-Análise descritiva

-Testes de hipóteses estatísticas: Teste de Qui-Quadrado, Teste de Mann-Witney; Teste de McNemar

O teste de Qui-Quadrado utilizou-se para averiguar se duas variáveis qualitativas estavam associadas. Este teste em tabelas de 2x2 em que as frequências esperadas em cada célula eram superiores cinco, e em tabelas com dimensões superiores em que no máximo 25% das células tinham frequência inferior a cinco.

O teste de Mann-Whitney utilizou-se como alternativa ao teste T-Student para duas amostras independentes, quando não se verificavam os pressupostos teóricos de aplicabilidade. O teste Mann-Whitney permite comparar medianas de variáveis em escala pelo menos ordinal.

O teste de McNemar é um teste equivalente ao teste do Qui-Quadrado para dados emparelhados. Utiliza-se em estudos tipo “antes” vs “depois” em que a escala de medida apresentada é nominal.

### **3.8. Considerações éticas**

Para realização deste estudo foi solicitada a apreciação da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Lisboa

Foi respeitado o princípio da confidencialidade. Os dados constantes nos questionários necessários ao estudo foram apenas transcritos para a base de dados criada pela investigadora. A ligação entre o questionário, a base de dados e as amostras colhidas foi feita pelo número e código de barras atribuído pelo técnico no momento da colheita (o técnico que está a fazer a colheita identifica com numero sequencial e código de barras o questionário, o consentimento informado, o papel de filtro e o tubo de EDTA). Os dados obtidos de cada participante tornaram-se anónimos e foram tratados estatisticamente, não sendo fornecidos a qualquer outra entidade.

Foi solicitado Consentimento Informado aos participantes no estudo. A participação foi voluntária, podendo o participante recusar participar no estudo ou interromper a sua participação a qualquer momento. Não havendo riscos relevantes nesta participação.

Os resultados do estudo serão divulgados na Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e junto da comunidade científica, não havendo qualquer conflito de interesses.

## **IV. RESULTADOS**

### **4.1. Características sociodemográficas**

Participaram neste estudo 312 indivíduos, 67.9% do género masculino e 32.1% do género feminino.

Verificou-se que a idade média era de 40.59 anos (SD=12.71 anos, min=18 anos e máx=80 anos, P<sub>25</sub>=30.25 anos, P<sub>50</sub>= 40.00 anos, P<sub>75</sub>=50.00 anos).

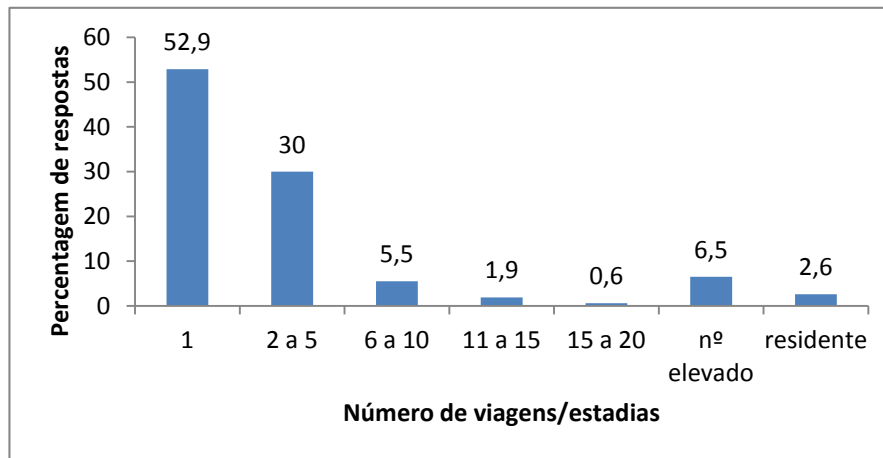
De um total de 302 indivíduos que responderam à questão sobre as habilitações literárias, 67.2% tinham o grau de licenciado ou superior, 22.2% tinham o ensino secundário (10º ao 12º ano de escolaridade), 7.0% tinham o 9º ano de escolaridade, 1.7% tinha estudado até ao 6º ano de escolaridade, ou equivalente, e 2.0% tinham apenas o 4º ano de escolaridade.

Verificou-se que 74.5% dos respondentes (228/306) eram naturais de Portugal, 12.7% eram naturais de Angola, 6.9% de Moçambique, 2.0% da Guiné Bissau, 0.7% de São Tomé e Príncipe, 0.3% de Cabo Verde. Os restantes inquiridos não eram naturais de países tropicais.

### **4.2. Estadias em países endémicos**

#### **4.2.1. Estadias em países endémicos e história de malária**

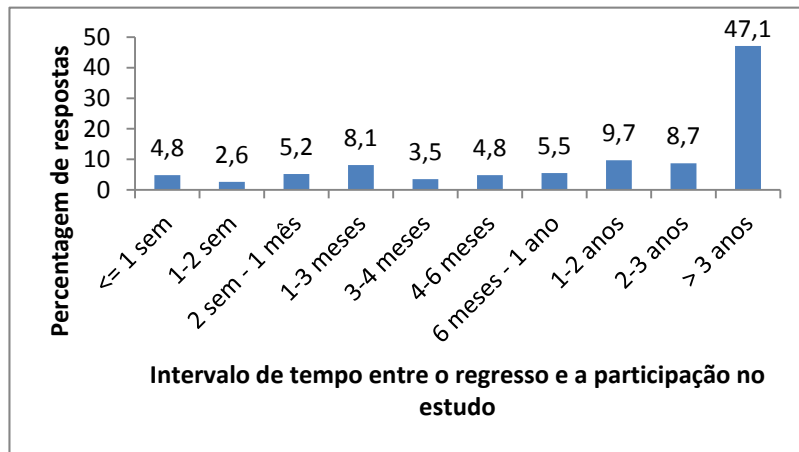
Dois dos participantes no estudo não responderam à questão sobre o número de viagens/estadias em países endémicos de malária. Dos restantes, oito (2.6%) residem habitualmente em zona endémica de malária, 20 (6.5%) têm um número elevado e indeterminado de viagens/estadias nestes países e os restantes têm um número de viagens ou estadias em países endémicos de malária que varia entre um e vinte (Gráfico 1), mais de metade deles tendo referido apenas uma viagem.



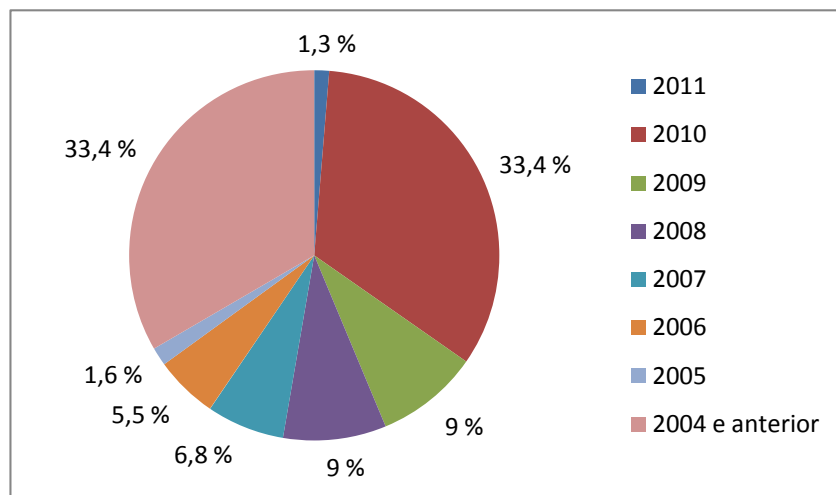
**Gráfico 1:** Número de viagens/estadias em países endémicos de malária (n=310).

Relativamente ao intervalo de tempo entre a data de regresso a Portugal e a participação no estudo, constata-se que quase metade do total de participantes (47.1%) se encontrava em Portugal há mais de 3 anos, havendo menos de dez por cento de participantes em cada uma das restantes categorias desta variável, verificando-se, também, que 29% estava há menos de seis meses em Portugal (Gráfico 2).

Para 33.4% dos respondentes, o ano da última estadia em países endémicos de malária foi 2010, e uma percentagem igual tinha estado nestes países no ano de 2004 ou em anos anteriores (Gráfico 3).



**Gráfico 2:** Intervalo de tempo entre a última estadia nos trópicos e a participação no estudo (total de participantes) (n=310).



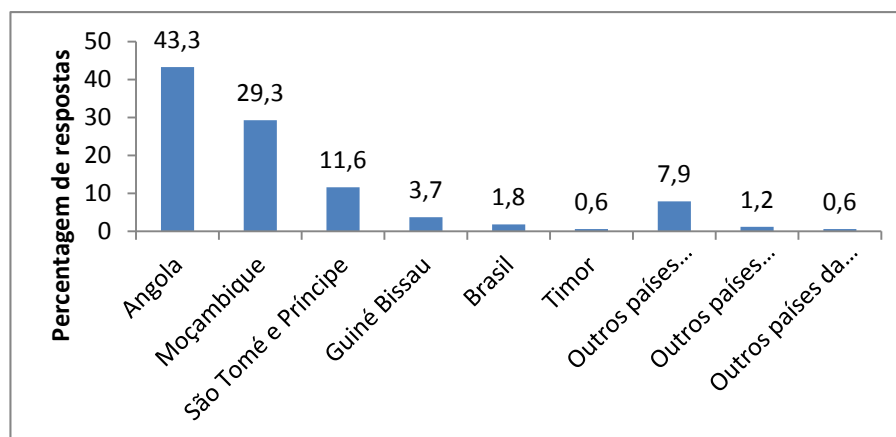
**Gráfico 3:** Ano da última estadia em países endémicos de malária (n=311).

No total de participantes no estudo, 19.8% (62/312) referiram história de malária e 2.5% (8/312) referiram desconhecer se alguma vez tinham tido esta doença. Para os que sabiam apontar uma data (n=57), o último diagnóstico de malária tinha-lhes sido feito entre 1 mês e 50 anos antes da participação no estudo (1 mês – 1.8%, 4 meses – 1.8%, 5 meses – 1.8%, 10 meses – 1.8%, >1 ano-2 anos – 3.6%, >2 anos-3 anos – 5.4%, >3 anos-4 anos – 3.6%, > 4

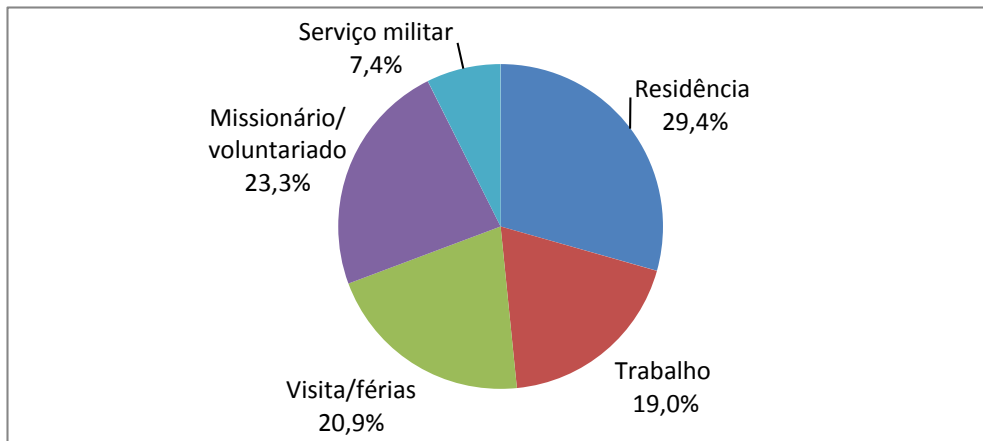
anos – 80.7%). Cinco participantes no estudo desconheciam a data em que tinham tido malária.

#### **4.2.2. Viajantes com uma viagem/estadia em países endêmicos de malária**

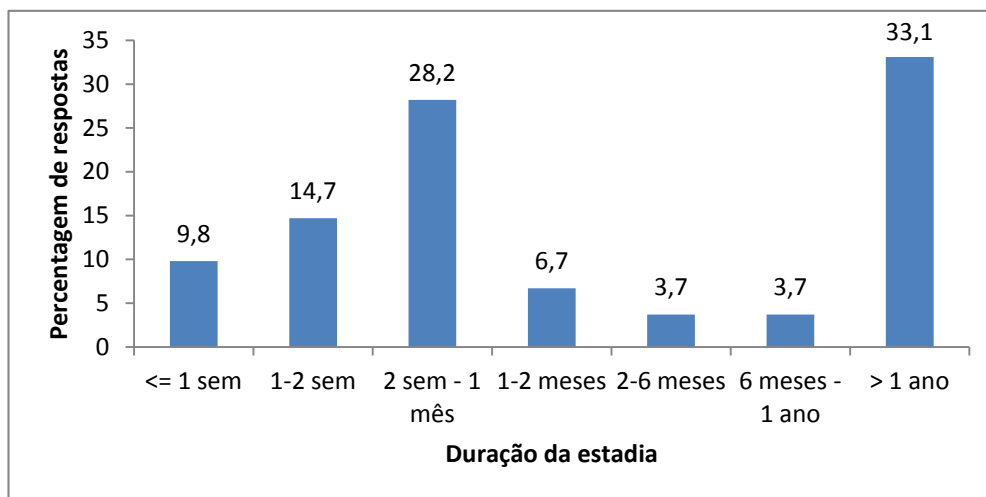
Dos viajantes com uma viagem/estadia em países endêmicos de malária (n=164), 43.3% estiveram em Angola, 29.3% em Moçambique e 11.6% em São Tomé e Príncipe (Gráfico 4). O principal motivo de estadia foi a residência (29.4%), seguido do trabalho missionário/voluntariado (23.3%) (Gráfico 5). Cerca de um quarto dos respondentes (28.2%) referiu uma estadia de 2 semanas a 1 mês e cerca de um terço (33.1%) referiu uma estadia superior a um ano (Gráfico 6); mais de metade (58.5%) terminaram esta primeira viagem/estadia mais de 3 anos antes da data de participação neste trabalho (Gráfico 7).



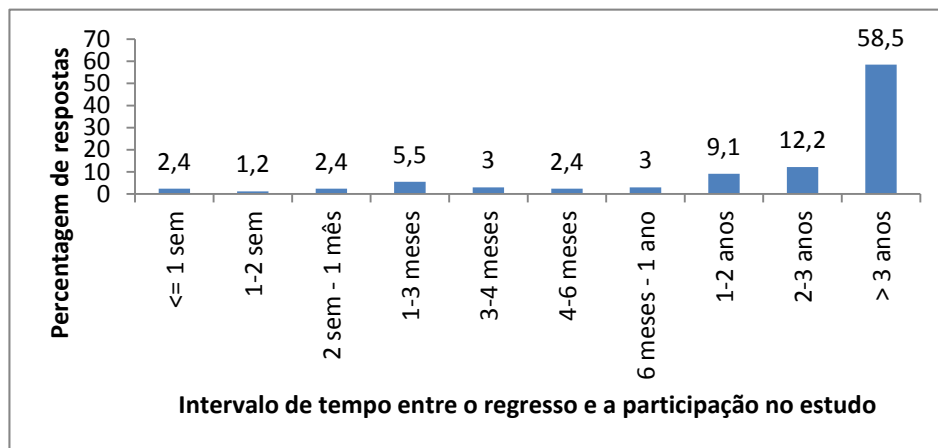
**Gráfico 4:** Países tropicais visitados/estadias pelo grupo com uma estadia em países endêmicos de malária.



**Gráfico 5:** Motivo da viagem/estadia (viajantes com uma viagem/estadia; n=163).



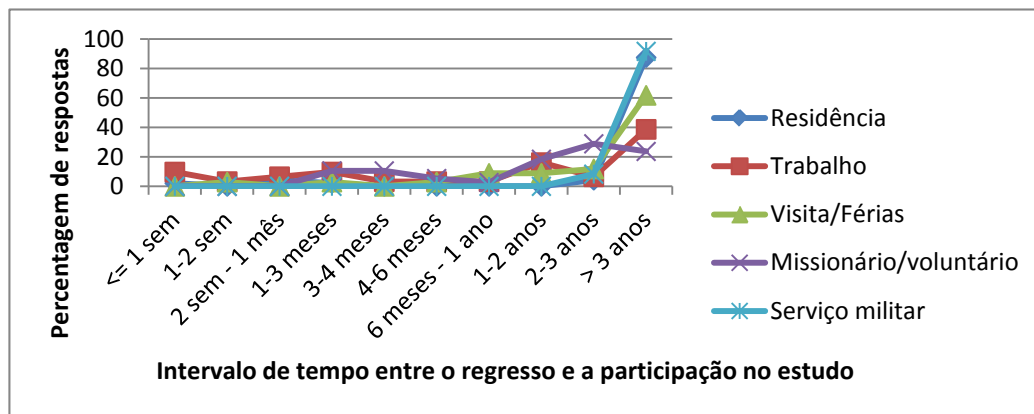
**Gráfico 6:** Duração da estadia em países endêmicos de malária (viajantes com uma viagem/estadia).



**Gráfico 7:** Intervalo de tempo entre o regresso da viagem/estadia e a participação no estudo (viajantes com uma viagem/estadia).

Para os viajantes cujo motivo de estadia foi a residência, 83,3% esteve nos trópicos num período superior a 1 ano; 67,7% dos que se deslocaram em trabalho e 94,0% dos que se deslocaram por visita/férias, referiu ter tido estadias de duração até 1 mês; 81,6% dos missionários/voluntários tiveram estadias entre 2 semanas e 1 mês e 75,0% dos que tinham cumprido serviço militar tiveram estadias superiores a 1 ano em países endémicos de malária.

O gráfico 8 mostra que em cada uma das categorias da variável “motivo de viagem” uma maior percentagem de indivíduos regressou a Portugal 2-3 anos ou mais antes de participar no estudo.



**Gráfico 8:** Intervalo de tempo entre o regresso da viagem/estadia e a participação no estudo de acordo com o motivo da viagem (viajantes com uma viagem/estadia).

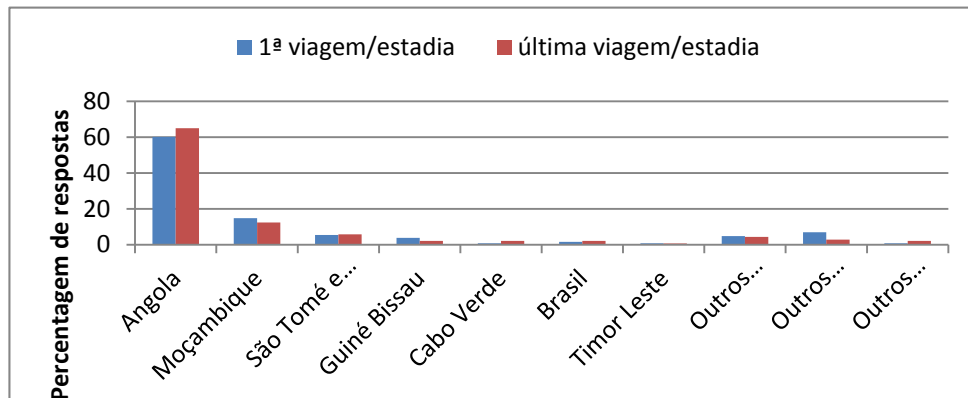
Relativamente à história de malária relacionada com esta viagem/estadia, 13.0% (21/161) deste grupo de participantes no estudo referiram ter tido malária, 95.2% deles durante a estadia e 4.8% no período entre 3-6 meses após o fim da viagem.

Quanto aos cuidados para evitar malária nesta viagem/estadia, 16.2% referiu não ter tido qualquer cuidado, 51.3% utilizaram mosquiteiro, 71.7% fizeram quimioprofilaxia da malária (destes, 58.5% com Mefloquina, 10.4% com Atovaquona/Proguanil, 1.9% com Doxiciclina, 2.8% com Cloroquina; 26.4% desconhecia a quimioprofilaxia feita), 7.4% utilizaram roupa protectora evitar a picada dos mosquitos e 26.8% aplicou repelente.

#### **4.2.3. Viajantes com mais de uma viagem/estadia em países endémicos de malária**

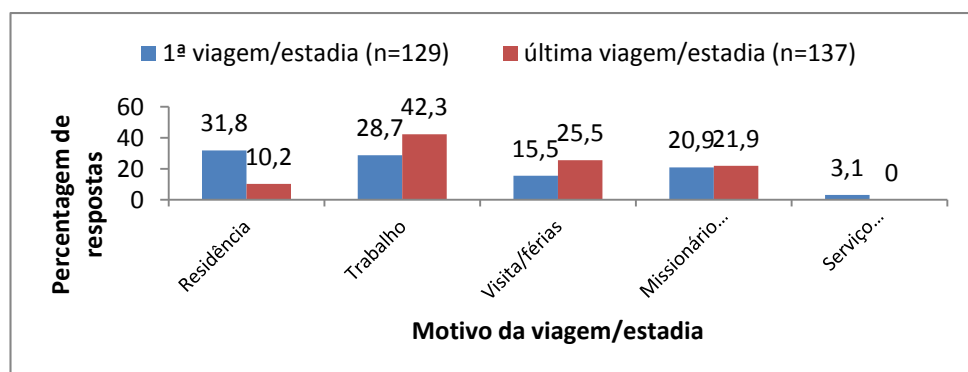
Dos viajantes com mais de uma viagem/estadia em países endémicos de malária (n=138), constata-se que a maioria fez a sua primeira viagem/estadia em países africanos, sendo Angola o país da primeira viagem/estadia para 60.2% destes respondentes e o país da última viagem/estadia para 65.0% deste grupo de respondentes. O gráfico 9 mostra a distribuição

percentual dos inquiridos com mais de uma viagem/estadia de acordo com o país onde estiveram na primeira e na última viagem/estadia.



**Gráfico 9:** Países tropicais visitados/estadias pelo grupo de viajantes com mais de uma estadia.

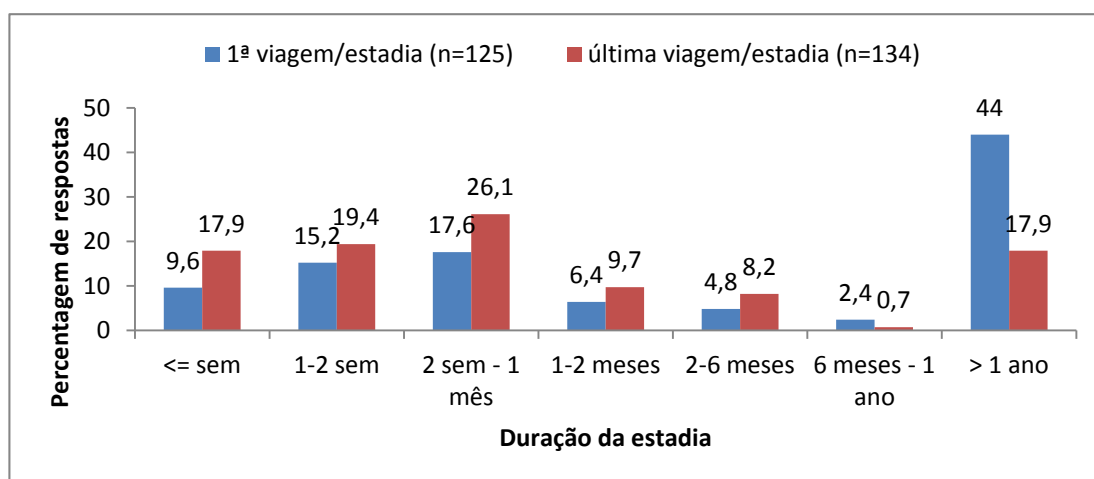
O principal motivo para a primeira viagem/estadia foi a residência (31,8%) logo seguido do trabalho (28,7%); na última estadia destaca-se claramente o motivo trabalho (42,3% dos inquiridos) (Gráfico 10).



**Gráfico 10:** Motivo da viagem/estadia (viajantes com mais de uma viagem/estadia).

Quanto à duração da estadia, na primeira viagem/estadia cerca de dois quintos (42.4%) dos respondentes tiveram uma estadia de duração até 1 mês e outros dois quintos (44.0%) tiveram uma estadia prolongada, superior a 1 ano. Na última estadia a maioria dos participantes no estudo (63.4%) teve uma estadia de duração até 1 mês e apenas 17.9% tiveram uma estadia de duração superior a 1 ano. (Gráfico 11)

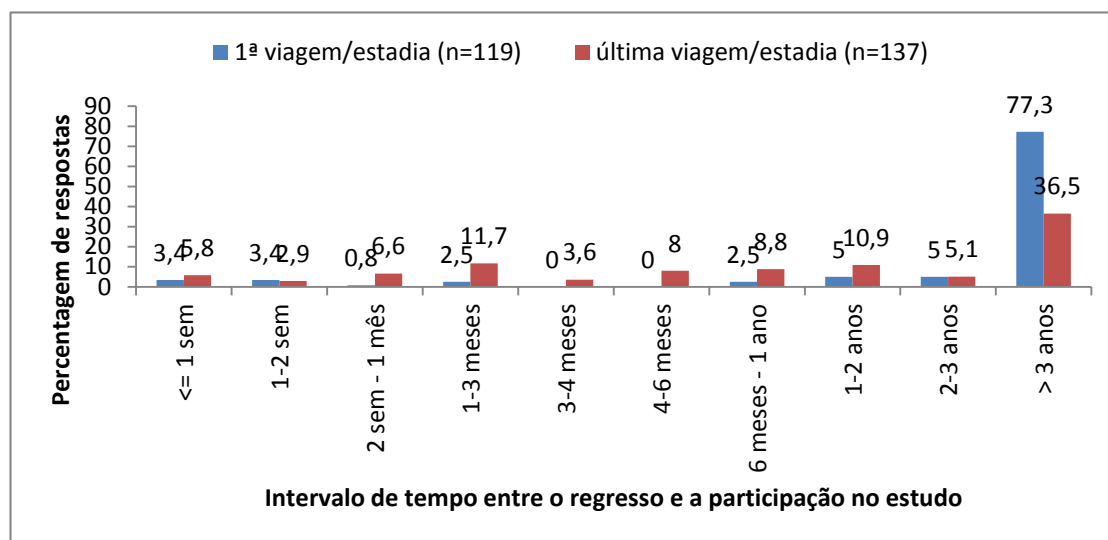
Quanto ao intervalo de tempo entre o regresso e a participação no estudo, quer na primeira quer na última viagem/estadia verifica-se que uma maior percentagem de indivíduos respondeu que tinha regressado há mais de 3 anos (Gráfico 12).



**Gráfico 11:** Duração da estadia em países endêmicos de malária (viajantes com mais de uma viagem/estadia).

Em relação à primeira viagem/estadia, para os viajantes cujo motivo foi a residência, a esmagadora maioria (95.1%) esteve nos trópicos num período de duração superior a 1 ano; 54.5% dos que se deslocaram em trabalho e 90,0% dos que se deslocaram por visita/férias referiram ter tido estadias de duração até 1 mês; 59,3% dos missionários/voluntários tiveram

estadias entre 2 semanas e 1 mês; todos os que se deslocaram devido ao serviço militar tiveram estadias superiores a 1 ano em países endêmicos de malária.



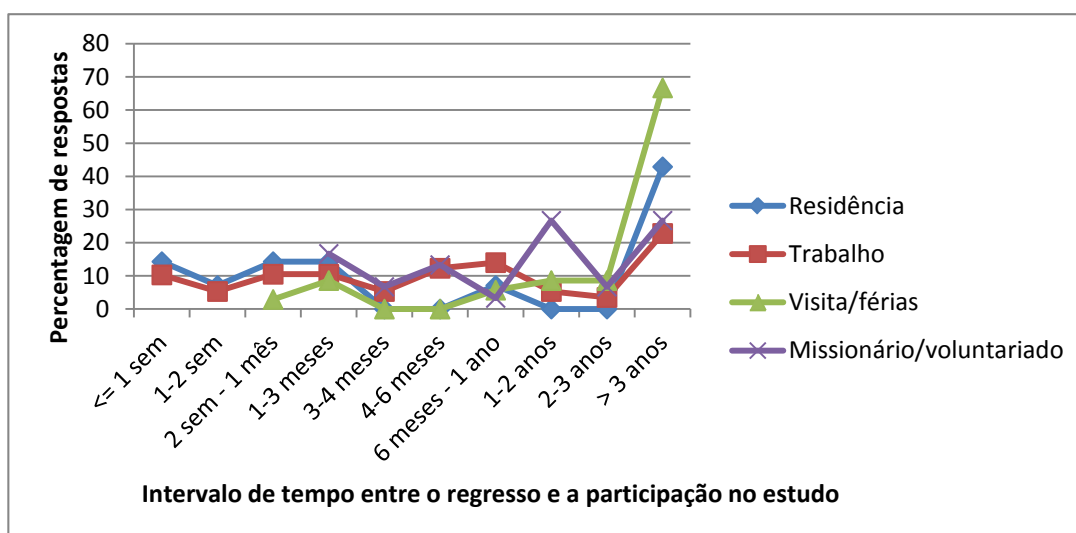
**Gráfico 12:** Intervalo de tempo entre o regresso da primeira e da última viagem/estadia e a participação no estudo (viajantes com mais de uma viagem/estadia).

Também em relação à última viagem/estadia, para os viajantes cujo motivo foi a residência, a maioria (92.9%; 13/14) esteve nos trópicos num período de duração superior a 1 ano; 58.9% dos que se deslocaram em trabalho e 91.4% dos que se deslocaram por visita/férias referiram ter tido estadias de duração até 1 mês; 44.8% dos missionários/voluntários tiveram estadias entre 2 semanas e 1 mês; nesta última viagem ninguém se deslocou por motivos militares.

Relativamente à primeira viagem/estadia, para cada uma das categorias da variável “motivo de viagem” uma maior percentagem de indivíduos teve a sua primeira viagem/estadia mais de 3 anos antes de participar no estudo (84.6% dos residentes, 58,6% dos que se deslocaram em

trabalho, 84,2% dos que viajaram por motivo de visita/férias, 77.8% dos missionários/voluntários e todos os que se deslocaram devido ao serviço militar.

O gráfico 13 mostra que em cada uma das categorias da variável “motivo de viagem” uma maior percentagem de indivíduos teve a sua última viagem/estadia mais de 3 anos antes de participar no estudo. 14.3% dos residentes e 10.5% dos que se deslocaram em trabalho encontravam-se em Portugal uma semana ou menos antes de participar no estudo, e 21.4% dos residentes, 15.8% dos que viajaram em trabalho e 2.9% dos que viajaram por férias, estavam em Portugal entre 1 semana e 1 mês antes de participarem no estudo.



**Gráfico 13:** Intervalo de tempo entre o regresso da última viagem/estadia e a participação no estudo de acordo com o motivo da viagem.

Relativamente à história de malária relacionada com estas viagens/estadias, 19.3% (23/119) dos indivíduos com mais de uma viagem/estadia referiram ter tido malária durante a primeira viagem/estadia e 6.6% (9/137) referiram ter tido malária durante a última viagem/estadia. Nenhum dos participantes no estudo teve malária após ter regressado a Portugal.

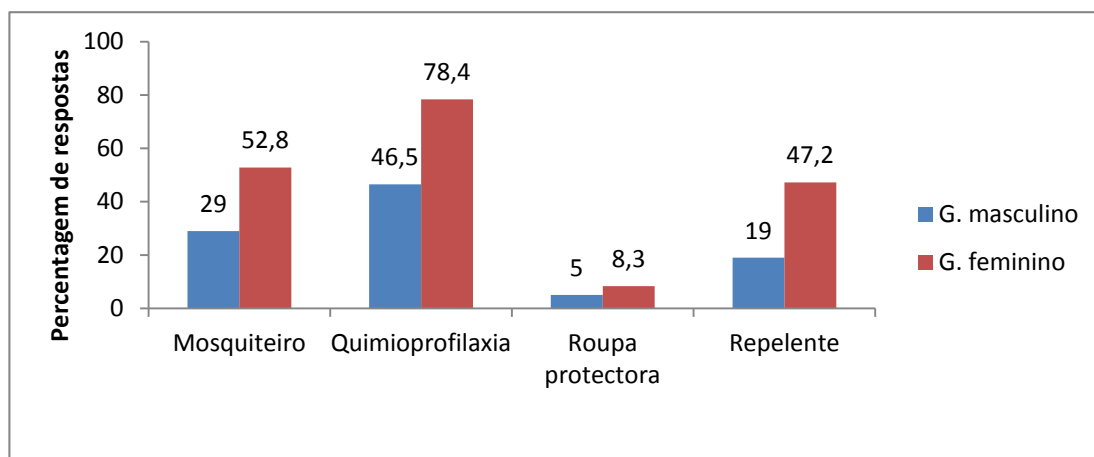
Quanto aos cuidados para evitar malária, constatou-se que um quarto dos indivíduos não teve qualquer cuidado quer na primeira, quer na última viagem/estadia. O quadro I mostra que o cuidado mais utilizado por estes viajantes para evitarem a malária é a toma de quimioprofilacticos, sendo a Mefloquina aquele que aparentemente é mais prescrito. A utilização de roupa protectora contra a picada dos mosquitos é referida por menos de dez por cento dos inquiridos e o uso de repelente é referido por cerca de um quarto.(Tabela 8)

**Tabela 8:** Cuidados para evitar a malária (viajantes com mais de uma viagem/estadia).

Cuidados	1ª viagem/estadia	Última viagem/estadia
Sem cuidados	23.1% (27/117)	27.4% (37/135)
Mosquiteiro	40.0% (46/115)	34.8% (47/135)
Medicamentos	66.4% (77/116)	55.6% (75/135)
Mefloquina	49.3% (37/75)	56.2% (41/73)
Atovaquona/proguanil	17.3% (13/75)	21.9% (16/73)
Cloroquina	10.7% (8/75)	2.7% (2/73)
Desconhece	22.7% (17/75)	19.2% (14/73)
Roupa protectora	8.9% (10/112)	5.9% (8/135)
Repelente	26.8% (30/112)	26.7% (36/135)

Encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os géneros relativamente ao facto de terem tido ou não cuidados para prevenir a malária na última viagem/estadia (n=136,  $X^2=8.805$ ,  $p = 0.003$ ) – a maioria dos respondentes do género feminino tiveram pelo menos um tipo de medidas de prevenção nesta viagem/estadia enquanto apenas cerca de dois terços de respondentes masculinos teve algum cuidado (F: 91.7% vs. M: 66.0%). No gráfico 14

podemos observar que uma maior percentagem de respondentes femininos utilizou cada uma das medidas preventivas, destacando-se entre elas a quimioprofilaxia, seguida pelo uso de mosquitoire e do repelente para cada um dos géneros.



**Gráfico 14:** Cuidados para evitar a malária nos respondentes dos géneros masculino e feminino (viajantes com mais de uma viagem/estadia).

Não se encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre quem utilizou ou não alguma medida para prevenir a malária relativamente ao motivo da última viagem/estadia ( $p=0.143$ ). Uma maior percentagem de residentes referiu não ter qualquer cuidado comparativamente aos outros viajantes (residentes: 42.9%, trabalho: 32.1%, visita/férias: 25.0%, missionários/voluntariado: 13.3%).

Também não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre quem utilizou ou não alguma medida para prevenir a malária relativamente à duração da última viagem/estadia ( $p = 0.547$ ) nem relativamente ao número de viagens realizadas ( $p = 0.250$ ).

Comparando a primeira com a última viagem realizada a um país endémico de malária, constatamos que a maioria dos respondentes mantém o seu comportamento – 15.5% (18/116) não têm qualquer medida preventiva e 68.1% (79/116) mantêm medidas preventivas. Apenas

6.9% (8/116) passam a ter o cuidado de utilizar medidas preventivas, enquanto 9.5% (11/116) deixaram de ter esses cuidados. Não se encontrou uma diferença estatisticamente significativa quanto à mudança de comportamento preventivo ( $p = 0.648$ ).

#### **4.2.4. Residentes em países endémicos de malária**

Apenas oito participantes no estudo referiram o residir como motivo da viagem/estadia. Todos residiam em Angola há mais de um ano e tinham chegado a Portugal menos de um mês antes de participarem no estudo. Cinco referiram ter tido malária durante o período de estadia. Quanto aos cuidados para evitar a malária, verifica-se que não são uniformes - cinco destes respondentes não tinha qualquer cuidado para evitar a malária, um usavam mosquiteiro e repelente, um usava mosquiteiro e tomava Cloroquina, um outro usava mosquiteiro, repelente e roupa protectora da picada dos mosquitos.

### **4.3. Conhecimentos sobre malária**

#### **4.3.1. Transmissão da malária**

Relativamente à forma de transmissão da malária, constatou-se que a quase totalidade dos respondentes (98.0%) sabia que a malária se transmite por picada de mosquito. Contudo, cerca de metade (51.6%) desconhece ou pensa que a transmissão pode ser feita através do consumo de águas e alimentos contaminados, e cerca de um terço (35.7%) desconhece ou pensa que pode haver transmissão sexual (Tabela 9).

**Tabela 9:** Percentagem de respostas sobre a forma de transmissão da malária

Forma de transmissão	Resposta		
	Sim	Não	Desconhece
Picada de mosquito (n=301)	98.0%	0	2.0%
Águas e alimentos contaminados (n=279)	32.6%	48.4%	19.0%
Transmissão sexual (n=272)	3.7%	64.3%	32.0%

Para procurar diferenças/associações entre as variáveis estudadas, cada questão sobre a transmissão de malária (picada de mosquito, águas e alimentos contaminados, transmissão sexual) foi tratada como uma variável com duas categorias de resposta, “resposta correcta” e “resposta incorrecta/desconhece”.

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os géneros relativamente a cada uma das opções colocadas como possível forma de transmissão da malária. Como se pode observar na Tabela 10, percentagens idênticas de indivíduos do género masculino e feminino reconhecem a transmissão da malária por picada de mosquito. Quanto à transmissão por águas e alimentos e à transmissão sexual, percentagens inferiores de indivíduos do género masculino respondem correctamente a estas questões.

Dos que responderam ter tido ou não malária, percentagens idênticas respondem correctamente à questão sobre transmissão por mosquito. Apenas se encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre quem teve ou não malária relativamente ao conhecimento sobre a transmissão sexual ( $n= 269$ ,  $X^2=5.731$ ,  $p=0.017$ ). Percentagens superiores de respondentes que tiveram malária respondem correctamente às várias questões sobre as

hipóteses de transmissão de malária, comparativamente com os que não tiveram esta doença.

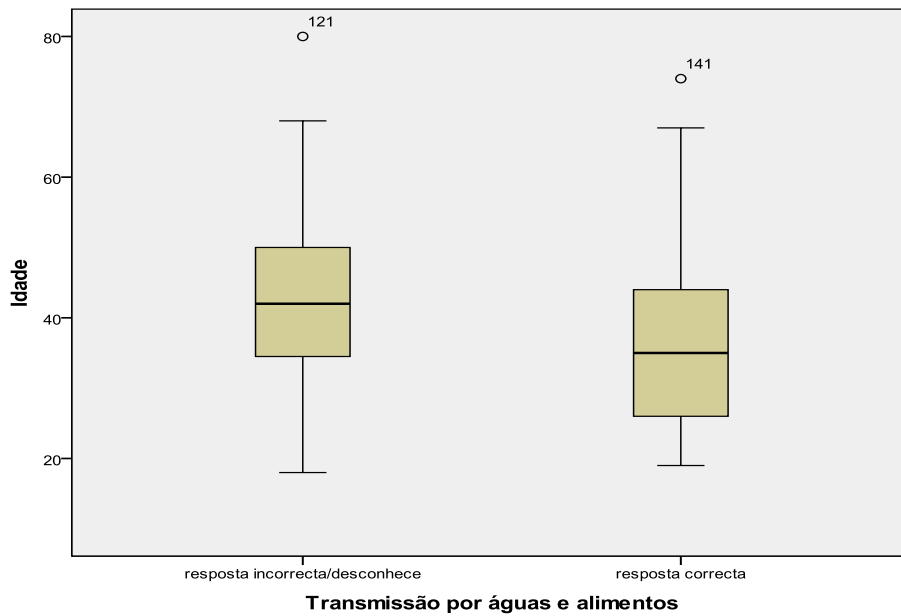
(Tabela 10)

**Tabela 10:** Comparação das proporções das variáveis “Transmissão por picada de mosquito”, “transmissão por águas e alimentos contaminados” e “transmissão sexual” nas categorias das variáveis “Género” e “Antecedentes de malária” ( $\alpha = 0.05$ ).

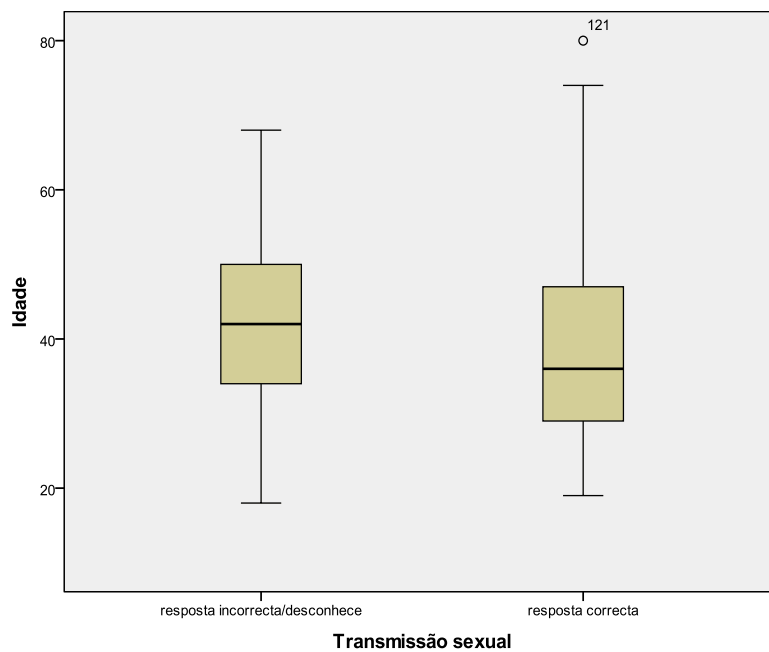
	Formas de transmissão da malária					
	Picada de mosquito		Águas e alimentos contaminados		Transmissão sexual	
	Respostas correctas		Respostas correctas		Respostas correctas	
Género masculino	97.5%	---	45.2%	p = 0.288	61.2%	p = 0.148
Género feminino	99.0%		54.9%		70.8%	
Teve malária	98.3%	---	57.7%	P = 0.120	78.4%	<b>P = 0.017</b>
Não teve malária	97.9%		45.7%		60.6%	

--- Inexistência de condições de aplicabilidade do teste do  $X^2$

Relativamente à idade, encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa entre quem responde correctamente e quem responde incorrectamente/desconhece sobre a possibilidade de transmissão da malária por águas e alimentos e sobre a possibilidade de transmissão sexual, (Tabela 11) – os participantes no estudo que respondem correctamente, têm, tendencialmente, uma idade inferior. Esta relação é ilustrada nos gráficos 15 e 16.



**Gráfico 15:** Variação da idade nas categorias da variável Transmissão da malária por águas e alimentos.



**Gráfico 16:** Variação da idade nas categorias da variável Transmissão da malária por via sexual.

Relativamente às habilitações literárias, encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa entre quem responde correctamente e quem responde incorrectamente/desconhece sobre a possibilidade de transmissão por águas e sobre a possibilidade de transmissão sexual (Tabela 11) – os participantes no estudo que respondem correctamente, têm, tendencialmente, um maior nível de escolaridade.

Relativamente ao número de viagens/estadias em países endémicos de malária, também se encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre quem responde correctamente e quem responde incorrectamente/desconhece sobre a possibilidade de transmissão por águas e sobre a possibilidade de transmissão sexual (Tabela 11) – os participantes no estudo que respondem correctamente, fizeram, tendencialmente, um maior número de viagens.

**Tabela 11:** Comparação das variáveis “Idade”, “Nível educacional” e “Número de viagens” nas categorias das variáveis “Transmissão por picada de mosquito”, “transmissão por águas e alimentos contaminados” e “transmissão sexual” – resultados do teste de Mann-Whitney ( $\alpha=0.05$ ).

	Formas de transmissão da malária	
Idade	Picada de mosquito	p = 0.096
	Águas e alimentos contaminados	<b>p &lt; 0.001</b>
	Transmissão sexual	<b>p = 0.005</b>
Habilitações literárias	Picada de mosquito	p = 0.051
	Águas e alimentos contaminados	<b>p &lt; 0.001</b>
	Transmissão sexual	<b>p = 0.019</b>
Nº de viagens/estadias (*)	Picada de mosquito	p = 0.309
	Águas e alimentos contaminados	<b>p = 0.001</b>
	Transmissão sexual	<b>p = 0.004</b>

(\*) excluídos os respondentes que residem em zona endémica de malária

### **4.3.2. Prevenção da malária**

Quanto à forma de prevenção da malária, constatou-se que a maioria dos respondentes conhecia a forma correcta de prevenção – 83.2% referiu medicação adequada e 90.2% referiu o evitar a picada dos mosquitos; menos de metade considerava correctamente que a prevenção não podia ser feita evitando o consumo de águas e alimentos ou através de vacinação (45.2% e 40.3% respectivamente) (Tabela 12).

**Tabela 12:** Percentagem de respostas sobre a forma de prevenção da malária.

Forma de prevenção	Resposta		
	Sim	Não	Desconhece
Medicamentos adequados (n=291)	83.2%	9.3	7.6%
Evitar a picada dos mosquitos (n=296)	90.2%	2.7%	7.1%
Evitar o consumo de águas e alimentos contaminados (n=272)	35.3%	45.2%	19.5%
Vacinação (n=278)	47.1%	40.3%	12.6%

Para procurar diferenças/associações entre as variáveis estudadas, cada questão sobre a prevenção da malária (medicamentos adequados, evitar a picada de insectos, evitar o consumo de águas e alimentos contaminados, vacinação) foi tratada como uma variável com duas categorias de resposta, “resposta correcta” e “resposta incorrecta/desconhece”.

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os géneros nem entre quem teve ou não malária, relativamente às formas de transmissão colocadas nas diversas

questões (Tabela 13). Percentagens idênticas de respondentes masculinos e femininos sabem que a toma de medicamentos e o evitar a picada de mosquitos são formas adequadas de prevenir a malária, e percentagens superiores de respondentes do género feminino sabem que esta doença não se evita pelo consumo de águas e alimentos nem pela vacinação. No mesmo quadro podemos observar que maiores percentagens de respondentes sem antecedentes de malária respondem correctamente às formas adequadas de prevenção da doença (medicamentos e evitar a picada).

**Tabela 13:** Comparação das proporções das variáveis de relacionadas com a prevenção “Medicamentos adequados”, “Evitar a picada de mosquito”, “Evitar o consumo de águas e alimentos contaminados” e “Vacinação” nas categorias das variáveis “Género” e “Antecedentes de malária” ( $\alpha = 0.05$ ).

	Género		P	Antecedentes de malária		P
	Masculino	Feminino		Sim	Não	
	Respostas correctas		P	Respostas correctas		P
Medicamentos adequados	82.9%	83.7%	0.868	76.4%	85.3%	0.106
Evitar picada de mosquitos	89.9%	90.8%	0.803	86.2%	91.0%	0.272
Evitar consumo de águas e alimentos contaminados	41.5%	52.8%	0.080	57.1%	42.0%	0.054
Vacinação	36.9%	47.3%	0.099	44.0%	39.7%	0.578

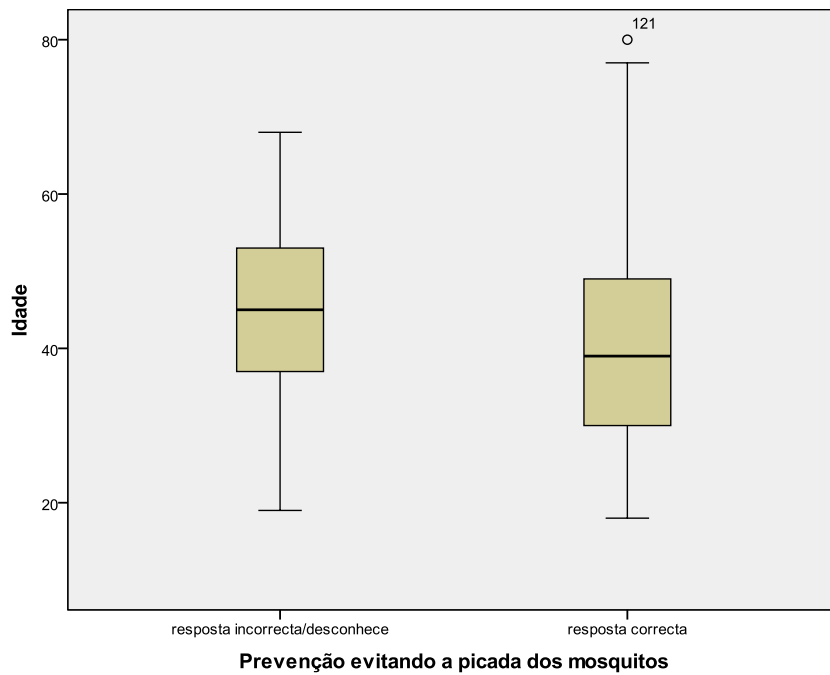
Relativamente à idade e às habilitações literárias, encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa entre quem responde correctamente e quem responde incorrectamente/desconhece sobre a prevenção da malária evitando a picada de mosquitos, evitando o consumo de águas e alimentos ou a vacinação (Tabela 14) – os participantes no

estudo que respondem correctamente, têm, tendencialmente, uma idade inferior e um maior nível de escolaridade. Nos gráficos 17, 18 e 19 pode ser observada a relação da variável idade com as variáveis correspondentes às questões sobre prevenção da malária.

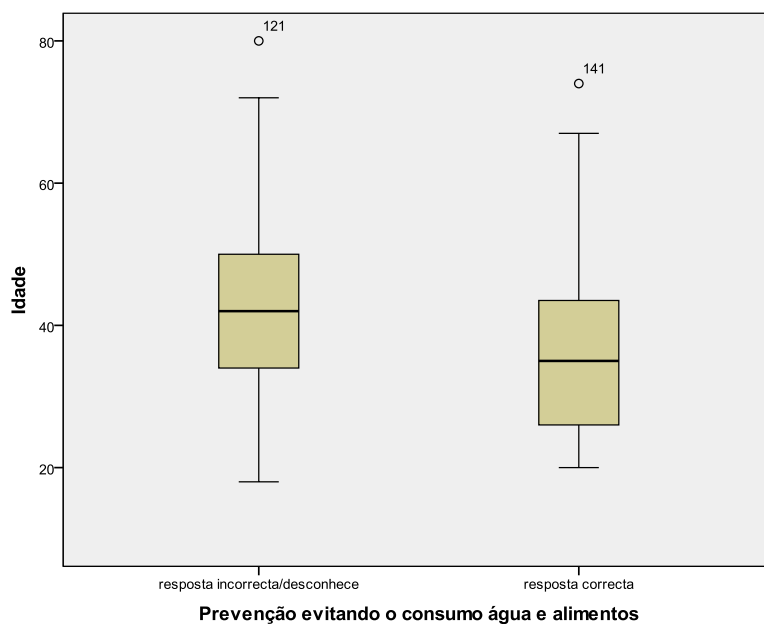
**Tabela 14:** Comparação das variáveis “Idade”, “Nível educacional” e “Número de viagens/estadias” nas categorias das variáveis relacionadas com a prevenção da malária “Medicamentos adequados”, “Evitar a picada de mosquito”, “Evitar o consumo de águas e alimentos contaminados” e “Vacinação” – resultados do teste de Mann-Whitney ( $\alpha=0.05$ ).

	Formas de prevenção da malária	
Idade	Medicamentos adequados	p = 0.315
	Evitar picada de mosquitos	<b>p = 0.049</b>
	Evitar consumo águas e alimento.	<b>p &lt; 0.001</b>
	Vacinação	<b>p &lt; 0.001</b>
Habilitações literárias	Medicamentos adequados	p = 0.285
	Evitar picada de mosquitos	<b>p &lt; 0.001</b>
	Evitar consumo águas e alimento.	<b>p &lt; 0.001</b>
	Vacinação	<b>p &lt; 0.001</b>
Nº de viagens/estadias (*)	Medicamentos adequados	p = 0.854
	Evitar picada de mosquitos	p = 0.147
	Evitar consumo águas e alimento.	<b>p &lt; 0.001</b>
	Vacinação	<b>p = 0.005</b>

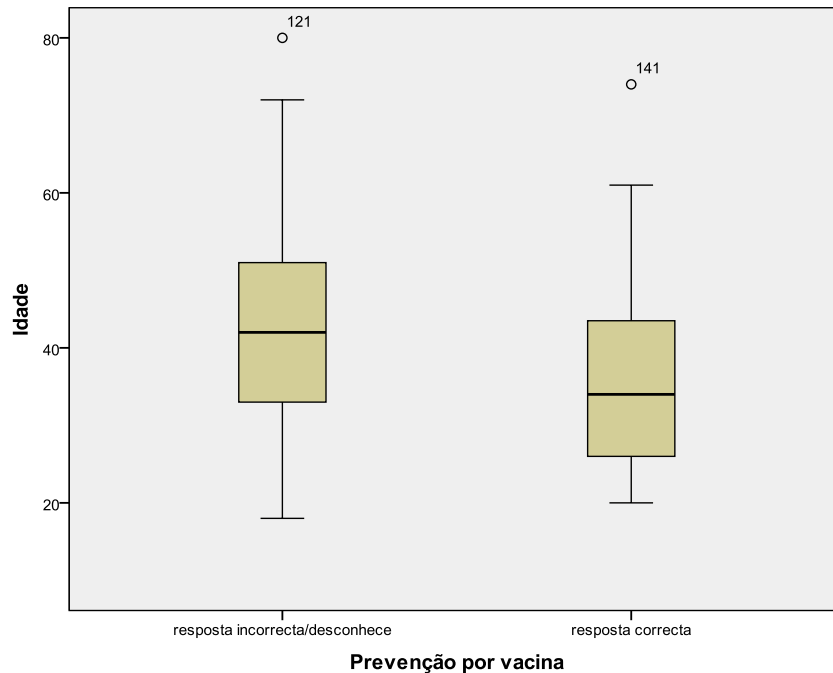
(\*) excluídos os respondentes que residem em zona endémica de malária



**Gráfico 17:** Variação da variável idade nas categorias da variável Prevenção da malária evitando a picada dos mosquitos.



**Gráfico 18:** Variação da variável idade nas categorias da variável Prevenção da malária evitando o consumo de águas e alimentos.



**Gráfico 19:** Variação da idade nas categorias da variável Prevenção da malária por vacinação.

Relativamente ao número de viagens/estadias em países endémicos de malária, encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa entre quem responde correctamente e quem responde incorrectamente/desconhece sobre a possibilidade de prevenção evitando o consumo de águas e alimentos contaminados e sobre a vacinação (Tabela 14) – os participantes no estudo que respondem correctamente, fizeram, tendencialmente, um maior número de viagens.

#### **4.3.3. Período de incubação e quadro clínico inicial**

Questionados sobre o período de incubação e o quadro clínico da malária, verifica-se que apenas dois quintos (39.6%) dos respondentes considerava que os sintomas da malária podem começar após uma semana de estadia em zona endémica, enquanto a maioria (cerca de quatro

quintos – 78.1%) considerava que os sintomas iniciais da malária se confundem com uma gripe (tabela 15). A percentagem de respondentes que referiu desconhecer o período de incubação da malária é elevada como se pode ver no quadro seguinte.

**Tabela 15:** Percentagem de respostas sobre o período de incubação e o quadro clínico inicial da malária

	Resposta		
	Sim	Não	Desconhece
Os sintomas da malária podem começar a partir de 1 semana de ter estado em zona endémica (n=298)	39.6%	14.4%	46.0%
Na maioria dos casos, os sintomas iniciais da malária confundem-se com uma gripe (n=301)	78.1%	4.0%	17.9%

A análise subsequente considerou uma recodificação das variáveis “período de incubação” e “quadro clínico inicial” nas duas categorias de respostas “resposta correcta” e “resposta incorrecta/desconhece”.

Não se encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre os géneros relativamente ao conhecimento sobre o quadro clínico inicial de malária ( $p = 0.054$ ) nem relativamente ao conhecimento sobre o período de incubação ( $p = 0.875$ ). Uma percentagem superior de respondentes do sexo feminino responde correctamente à questão sobre o quadro clínico

inicial (F: 84.7%, M: 74.9%), não se verificando esta diferença percentual quanto ao conhecimento sobre o período de incubação (F: 38.9%, M: 39.9%).

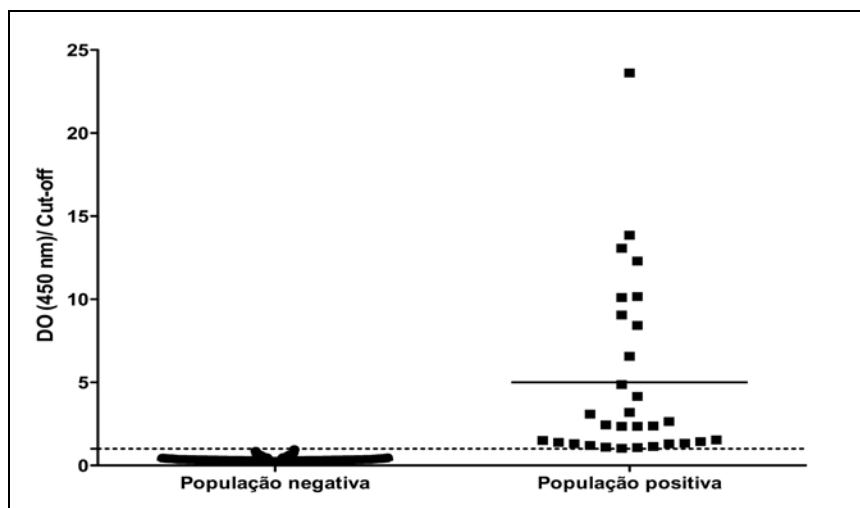
Também não se encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre os respondentes que tiveram ou não malária relativamente ao conhecimento sobre o quadro clínico inicial desta doença ( $p = 0.169$ ), mas verificou-se uma diferença estatisticamente significativa relativamente ao conhecimento sobre o período de incubação ( $n=294$ ,  $X^2=4.151$ ,  $p = 0.042$ ) – uma percentagem superior de respondentes com antecedentes de malária responderam correctamente (51.8% vs. 37.0%).

Não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre quem conhece ou não o quadro clínico inicial da malária relativamente à idade ( $p = 0.151$ ), nem relativamente ao nível de escolaridade ( $p = 0.137$ ), mas verificou-se esta diferença relativamente ao número de viagens realizadas (M-W teste,  $p < 0.001$ ) – os participantes no estudo que responderam correctamente fizeram, tendencialmente, mais viagens do que os que responderam incorrectamente a esta questão.

Também não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre quem responde correctamente ou não sobre o período de incubação da malária relativamente à idade ( $p = 0.971$ ), mas encontrou-se esta diferença relativamente ao nível de escolaridade (M-W teste,  $p = 0.048$ ) e ao número de viagens/estadias em países com malária (M-W teste,  $p = 0.004$ ).

#### **4.4. Ensaio laboratoriais para a determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp por ELISA e para a pesquisa de *Plasmodium falciparum* por PCR**

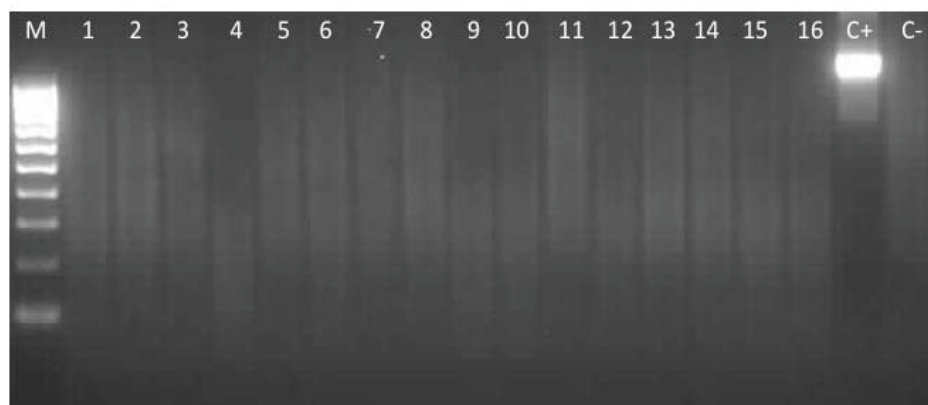
Amostras de plasmas dos indivíduos estudados foram avaliados quanto à presença de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp, determinados por um ELISA comercial (Bio-Rad). O gráfico 20 apresenta a distribuição da frequência da reactividade serológica de todos os indivíduos estudados (n=312). Os dados obtidos de cada indivíduo são apresentados em função da relação da densidade óptica obtida da reacção (DO) e o valor de *Cut-off*, determinado por ensaio. A população serologicamente negativa apresenta o valor da relação DO/*Cut-off* igual ou inferior a uma unidade. Por outro lado, a população serologicamente positiva apresenta o valor da relação DO/*Cut-off* superior a uma unidade. Do total de participantes no estudo, 31 indivíduos apresentaram resultados serológicos positivos para *Plasmodium* spp.



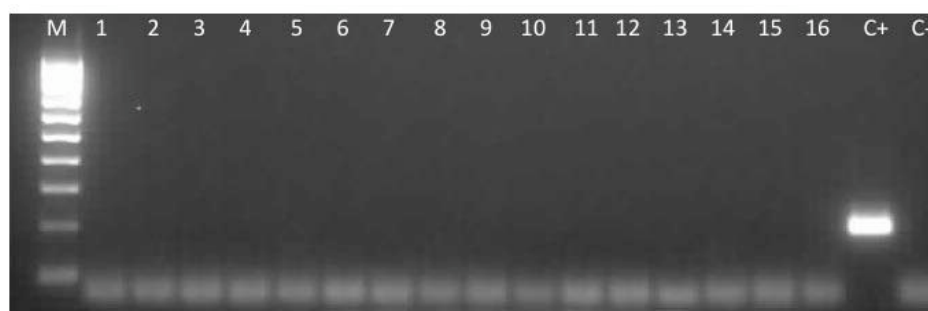
**Gráfico 20:** Distribuição da frequência de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp nas amostras de plasma dos indivíduos estudados. A linha descontinua apresenta o ponto de referência de uma unidade da relação DO/*Cut-off*. DO: densidade óptica da reacção a 450 nm; *Cut-off*: valor de referência determinado em cada reacção de ELISA.

Todos os indivíduos com serologia positiva apresentaram resultados negativos na pesquisa de infecção por PCR.

**A**



**B**

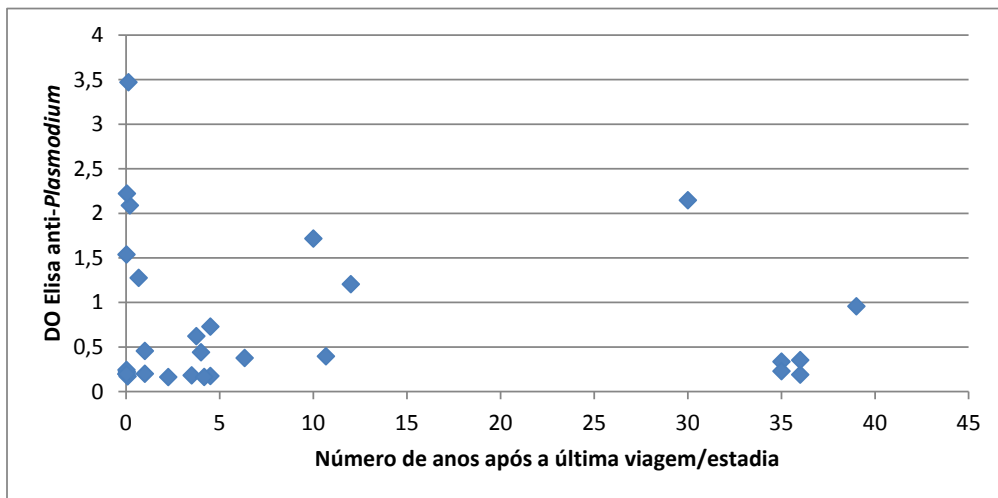


**Figura 4:** Pesquisa de *Plasmodium falciparum* por PCR nas amostras de sangue dos indivíduos serologicamente positivo para *Plasmodium* spp. A: amplificação da sequência específica para *Plasmodium* spp; B: amplificação da sequência específica para *Plasmodium falciparum*. C+ (controlo positivo); C- (controlo negativo).

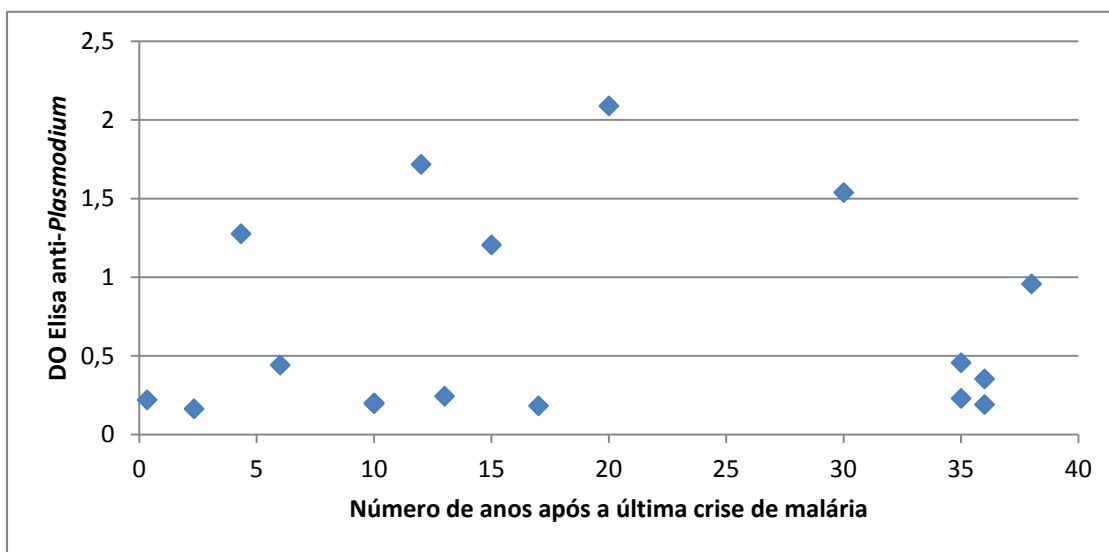
A tabela 16 caracteriza os participantes com serologia positiva, nos aspectos sociodemográficos, estadia em países endémicos de malária e história de doença. Como se pode observar neste quadro:

- Doze respondentes são naturais de Portugal e os restantes dezanove são naturais de países tropicais africanos (Angola, na sua maioria, e Guiné Bissau, Moçambique e São Tomé e Príncipe);

- Cinco são residentes em zona endémica, quatro já realizaram um número elevado e indeterminado de viagens, e os restantes realizaram entre 1 e 8 viagens/estadias;
- A maioria destes indivíduos (80.0%, 24/30) refere que a primeira viagem/estadia teve uma duração superior a 1 ano; para mais de metade (17/30) a última viagem/estadia também durou mais de 1 ano, dois quintos (12/30) estiveram até 6 meses em zona endémica, os restantes tiveram uma estadia entre 6 meses a 1 ano em zona endémica na sua última viagem/estadia;
- Cerca de metade dos respondentes (16/29) regressaram dos trópicos mais de 3 anos antes do início do estudo (dos quais seis há mais de 30 anos e três há cerca de 10 anos), um terço (9/29) regressou menos de 4 meses antes do início do estudo, os restantes regressaram entre 4 meses e 3 anos antes do início do estudo;
- Um terço (10/29) referiu não ter tido malária; dos que tiveram malária e referiram a data da última crise, um respondente tinha tido malária cerca de 4 meses antes do início do estudo, um tinha tido cerca de 2 anos antes, um outro cerca de 4 anos antes e os restantes tinham tido malária mais de cinco anos antes do início do estudo;
- Cerca de um terço não utilizou qualquer medida de prevenção da malária na sua última viagem/estadia.
- Os valores da densidade óptica observados para o teste Elisa anti-*Plasmodium* variam entre 0.164 e 3.472, não parecendo haver uma relação deste valor com o tempo que decorreu desde a última crise de malária nem com o tempo desde que regressaram a última vez de área endémica (gráficos 21 e 22).
- Quatro participantes no estudo mostraram resultados negativos para anticorpos anti-*Plasmodium falciparum*.



**Gráfico 21:** Relação entre o número de anos após o diagnóstico de malária e os valores de densidade óptica (DO) obtidas na reacção para a pesquisa de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp.



**Gráfico 22:** Relação entre o número de anos após a última viagem/estadia e os valores de densidade óptica (DO) obtidas na reacção para a pesquisa de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp.

**Tabela 16:** Características sociodemográficas, estadias em países endêmicos, história de malária e resultados laboratoriais nos participantes no estudo com serologia positiva para *Plasmodium* spp.

Nº de ordem	Género, idade, habilitações	Naturalidade	Nº de viagens/estadias	Ano da última viagem/estadia	Motivo da última viagem/estadia	Tempo entre última viagem/estadia e participação no estudo	Duração da 1ª viagem/estadia	Duração da última viagem/estadia	História de malária	Última crise de malária	Medidas de prevenção da malária na última estadia	DO ELISA anti- <i>Plasmodium</i>
1	F, 41 anos, 12º ano	Angola	Muitas	2010	Trab.	1-2 sem	-	-	Sim	4 meses	Medica.	0.221
2	M, 42 anos, 12º ano	Angola	2	2010	Trab.	1,5 mês	> 1 ano	2 sem – 1 mês	-	-	Medica.	3.472
3	M, 42 anos, 9º ano	Port.	1	1974	Militar	36 anos	> 1 ano	> 1 ano	Sim	36 anos	Medica. Mosquit.	0.191
4	M, 57 anos, 9º ano	Angola	2	2010	Trab.	-	-	2 sem – 1 mês	-	-	Não	0.350
5	F, 22 anos, licenc.	Angola	-	-	-	-	> 1 ano	-	sim	-	-	1.544
6	M, 61 anos, licenc.	Angola	Muitas	2010	Resid.	< 1 sem	> 1 ano	> 1 ano	Sim	20 anos	-	2.090
7	F, 48 anos, 12º ano	Guiné Bissau	1	1998	Resid.	12 anos	> 1 ano	> 1 ano	Sim	15 anos	Medica.	1.206
8	M, 56 anos, 12º ano	Port.	1	2006	Visita/férias	4,5 anos	1-2 sem	1-2 sem	Não	-	Mosquit. Repellent.	0.176

Nº de ordem	Género, idade, habilitações	Naturalidade	Nº de viagens/estadias	Ano da última viagem/estadia	Motivo da última viagem/estadia	Tempo entre última viagem/estadia e participação no estudo	Duração da 1ª viagem/estadia	Duração da última viagem/estadia	História de malária	Última crise de malária	Medidas de prevenção da malária na última estadia	DO ELISA anti- <i>Plasmodium</i>
9	F, 52 anos, 12º ano	Port.	Reside	2010	Resid.	1 mês	> 1 ano	> 1 ano	Não	-	Não	0.172
10	F, 41 anos, licenc.	Angola	Reside	2010	Resid.	2 sem	> 1 ano	> 1 ano	Não	-	Mosquit. Repeleto.	2.223
11	M, 77 anos, licen.	Port.	8	2000	Visita/férias	10 anos	> 1 ano	< 1 sem	Sim	12 anos	Não	1.718
12	M, 25 anos, licenc.	Guiné Bissau	1	2005	Resid.	4 anos	> 1 ano	> 1 ano	Sim	6 anos	Não	0.442
13	F, 44 anos, 12º ano	Angola	1	1975	Resid.	35 anos	> 1 ano	> 1 ano	Não	-	Não	0.337
14	H, 55 anos, 12º ano	Moçam	Muitas	2010	Resid.	< 1 sem	2-6 meses	2-6 meses	Sim	10 anos	Não	0.199
15	H, 43 anos, licen.	Angola	Reside	2010	Resid.	< 1 sem	> 1 ano	> 1 ano	Sim	30 anos	Não	1.539
16	H, 59 anos, 9º ano	Angola	Reside	2010	Resid.	< 1 sem	> 1 ano	> 1 ano	Sim	13 anos	Não	0.244
17	F, 50 anos, licenc.	Port.	2	2007	Trab.	3,5 anos	> 1 ano	> 1 ano	Sim	17 anos	Não	0.183
18	M, 59 anos, 12º ano	Port.	3	2009	Visita/férias	1 ano	> 1 ano	2 sem – 1 mês	Sim	35 anos	Mosquit. Repeleto.	0.457
19	M, 49 anos, 12º ano	Moçam	3	2006	Visita/férias	4 anos e 2 meses	> 1 ano	1-2 sem	Não	-	Medic. Mosquit,	0.165
20	M, 28 anos, licenc.	Port.	3	2008	Trab.	2 anos e 3 meses	-	2-6 meses	Sim	2 anos e 4 meses	Não	0.164

Nº de ordem	Género, idade, habilitações	Naturalidade	Nº de viagens/estadias	Ano da última viagem/estadia	Motivo da última viagem/estadia	Tempo entre última viagem/estadia e participação no estudo	Duração da 1ª viagem/estadia	Duração da última viagem/estadia	História de malária	Última crise de malária	Medidas de prevenção da malária na última estadia	DO ELISA anti- <i>Plasmodium</i>
21	F, 53 anos, licenc.	Angola	2	2007	Visita/férias	4,5 anos	> 1 ano	1-2 sem	Não	-	Mosquit.	0.730
22	M, 45 anos, licenc.	Port.	1	2009	Trab.	3 anos e 9 meses	1-2 sem	1-2 sem	Não	-	-	0.623
23	F, 50 anos, 9º ano	Angola	1	2000	Resid.	10 anos e 8 meses	> 1 ano	> 1 ano	Não	-	-	0.397
24	M, 59 anos, 12º ano	Port.	1	1975	Militar	35 anos	> 1 ano	> 1 ano	Sim	35 anos	Não	0.230
25	H, 50 anos, 4º ano	Angola	Reside	2010	Resid.	1 sem	> 1 ano	> 1 ano	Sim	10 anos	Mosqui. Repelent. Roupa	0.197
26	M, 62 anos, 9º ano	Port.	1	1972	Militar	39 anos	> 1 ano	> 1 ano	Sim	38 anos	Mosquit.	0.958
27	M, 47 anos, -	Guiné Bissau	Muitas	2010	Visita/férias	1 ano	> 1 ano	1-2 sem	Sim	10 anos	Mosquit.	0.201
28	M, 57 anos, 4º ano	Port.	1	1975	Militar	36 anos	2-6 meses	2-6 meses	Sim	36 anos	-	0.354
29	M, 44 anos, licenc.	São Tomé	1	1981	Resid.	30 anos	> 1 ano	> 1 ano	Não	-	Não	2.148
30	M, 45 anos, licenc.	Angola	7	2004	Trab.	6 anos e 4 meses	> 1 ano	6 meses - 1 ano	Não	-	Repelent.	0.378
31	F, 37 anos, licent.	Port.	3	2010	Trab.	8 meses	> 1 ano	> 1 ano	Sim	4 anos e 4 meses	-	1.277

- Inexistência de dados

DO: densidade óptica

A tabela 17 mostra que a maioria dos participantes no estudo (76.6%) não tem história de malária e a sua serologia para *Plasmodium* é negativa; uma pequena percentagem (6.2%) refere ter tido malária e apresenta serologia positiva, apresentando os restantes uma história de malária com serologia negativa (14.0%), ou uma serologia positiva com história negativa (3.2%). Dois respondentes com serologia positiva desconheciam se tinham tido malária e não foram contabilizados neste quadro.

Verifica-se uma associação estatisticamente significativa entre a variável Serologia positiva ou negativa para *Plasmodium* e a variável História de malária (n = 308,  $X^2=41.019$ ,  $p < 0.001$ ).

**Tabela 17:** Distribuição dos participantes no estudo consoante a sua história de malária e os resultados serológicos para *Plasmodium* spp.

		Serologia negativa	Serologia positiva	Total
História de malária	Não	236 76.6%	10 3,2%	246 79.9%
	Sim	43 14.0%	19 6.2%	62 20.1%
Total		279 90.6%	29 9.4%	308 100.0%

A tabela 18 mostra a distribuição percentual dos participantes no estudo “com história de malária e serologia positiva”, “com história de malária e serologia negativa” e “sem história de malária e serologia positiva”, de acordo com variáveis de caracterização

sócio-demográfica, estadias em países endémicos e serologia para *Plasmodium*.

Observa-se que:

- Nos grupos I e II percentagens idênticas são naturais de Portugal e de países endémicos para malária, mas no grupo III a maioria nasceu em países endémicos;
- É no grupo II (história de malária e serologia negativa) que se observa uma percentagem mais baixa de residentes (7.0%); cerca de um terço dos elementos dos grupos I e II realizou apenas uma viagem/ estadia em zona endémica de malária;
- Cerca de metade ou mais de metade dos indivíduos dos três grupos fizeram a sua última viagem/estadia mais de 3 anos antes do início do estudo, mas nos grupos I e II, dez a vinte por cento participaram no estudo na primeira semana de estadia em Portugal;
- Um terço (grupos I e II) a metade (grupo III) destes indivíduos refere a residência como motivo para a última viagem/estadia, um quarto tem como motivo o trabalho e um sexto (grupos I e II) a um terço (grupo III) viajaram por visita/férias;
- Quer na primeira quer na última viagem/estadia, o tempo de permanência foi superior a um ano para mais de metade dos indivíduos;
- Para os que tiveram malária, a data da última crise varia entre 4 meses e 38 anos no grupo I, e entre 1 mês e 50 anos no grupo II, verificando-se que metade dos indivíduos teve malária menos de 14-15 anos antes de participar no estudo
- Nos grupos com serologia positiva para anticorpos anti-*Plasmodium*, a maioria dos indivíduos (cerca de oitenta por cento) apresenta uma serologia positiva *P. falciparum*.

**Tabela 18:** Característica sociodemográfica, estadias em países endêmicos, história de malária, "história de malária e serologia positiva" "história de malária e serologia negativa" e "sem história de malária e serologia positiva" para *Plasmodium* spp.

	I - História de malária e serologia positiva (%)	II - História de malária e serologia negativa (%)	III - Sem história de malária e serologia positiva (%)
Naturalidade	(n = 19)	(n = 42)	(n = 10)
Portugal	47.4	52.4	30.0
País com malária endémica	52.6	47.6	70.0
Nº de viagens/estadias em países endêmicos	(n = 18)	(n = 43)	(n = 10)
1	33.3	34.9	50.0
> 1	27.9	44.2	30.0
nº indeterminado	22.2	14.0	-
residente	16.7	7.0	20.0
Tempo entre última viagem/estadia e a participação no estudo	(n = 18)	(n = 43)	(n = 10)
≤ 1 sem	22.2	9.3	-
1 sem – 4 meses	5.6	18.6	20.0
4 – 6 meses	-	4.7	-
6 meses – 1 ano	5.6	4.7	-
1 -3 anos	16.7	16.3	-
> 3 anos	50.0	46.5	80.0
Motivo da última viagem/estadia em país com malária endémica	(n = 18)	(n = 42)	(n = 10)
residência	38.9	35.7	50.0
trabalho	22.2	26.2	20.0
visita/férias	16.7	11.9	30.0
missionário/voluntariado	-	19	-
serviço militar	22.2	7.1	-
Duração da 1ª viagem/estadia em país com malária endémica	(n = 18)	(n = 42)	(n = 10)
≤ 1 mês	-	11.9	20.0
1 – 6 meses	11.5	4.8	-
6 meses – 1 ano	-	7.1	-
> 1 ano	88.9	76.2	80.0
Duração da última viagem/estadia em país com malária endémica	(n = 18)	(n = 42)	(n = 10)
≤ 1 mês	16.7	38.1	40.0
1 – 6 meses	16.7	11.9	-
6 meses – 1 ano	-	4.8	10.0
> 1 ano	66.7	45.2	50.0
Tempo entre última crise de malária e a participação no estudo	(n = 19)	(n = 43)	n.a.
min	4 meses	1 mês	
máx	38 anos	50 anos	
P <sub>25</sub>	9 anos	4,5 anos	
P <sub>50</sub>	14 anos	15 anos	
P <sub>75</sub>	35 anos	36 anos	

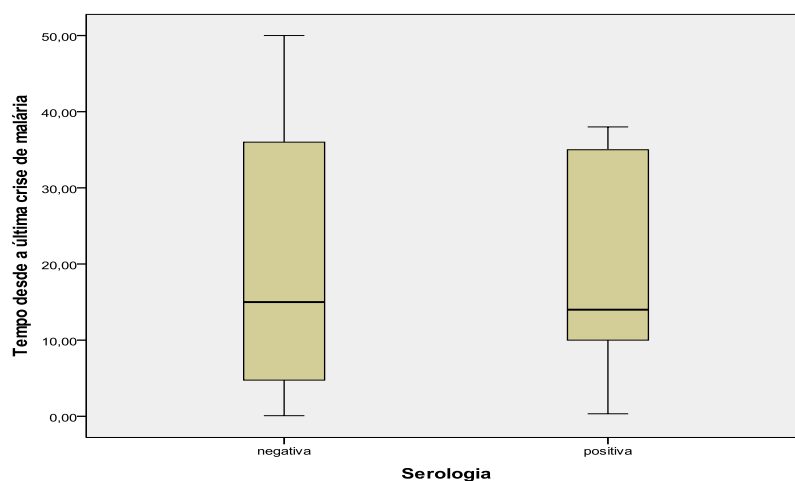
- Sem dados

n.a. : não aplicável

Considerando todos os participantes no estudo, testou-se a relação estatística entre a variável Serologia positiva ou negativa para *Plasmodium* spp e as variáveis País de nascimento, Número de viagens/estadias (excluídos os naturais de país endémico de malária que aí são residentes), Tempo desde a última viagem/estadia, Tempo desde a última malária, Motivo da primeira viagem/estadia, Motivo da última viagem/estadia, Duração da primeira viagem/estadia, Duração da última viagem/estadia.

Verificou-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre quem tinha serologia positiva e quem tinha serologia negativa relativamente ao número de viagens ( $p = 0.350$ ), nem relativamente ao tempo desde a última viagem/estadia ( $p = 0.911$ ).

Também não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre quem tinha serologia positiva e quem tinha serologia negativa relativamente ao tempo decorrido desde a última crise de malária (Teste de Mann-Whitney,  $p = 0.884$ ). A variação do tempo desde a última crise de malária nas categorias da variável Serologia para *Plasmodium* spp pode ser observada no gráfico 23.



**Gráfico 23:** Variação do tempo desde a última crise de malária nas categorias da variável Serologia para *Plasmodium* spp.

Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre quem tinha serologia positiva e quem tinha serologia negativa relativamente:

- ao país de nascimento ( $n = 306$ ,  $X^2=29.087$ ,  $p < 0.001$ ) – o grupo com serologia positiva apresenta uma percentagem superior de indivíduos que nasceram em países com malária endémica (P: 61.3%, N: 18.5%);
- à duração da primeira viagem/estadia (Teste de Mann-Whitney;  $p < 0.001$ ) e relativamente à duração da última viagem/estadia (Teste de Mann-Whitney;  $p = 0.001$ ) – quem tem serologia positiva tem, tendencialmente, estadias de duração superior;
- ao motivo da primeira viagem/estadia ( $n = 302$ ,  $X^2=30.863$ ,  $p < 0.001$ ), constatando-se que no grupo de indivíduos com serologia positiva existe uma percentagem maior de residentes (P: 64.5%, N: 28.8%) e de indivíduos que cumpriram o serviço militar (P: 16.1%, N: 4.1%); verifica-se o mesmo relativamente ao motivo da última viagem/estadia ( $n = 309$ ,  $X^2=20.031$ ,  $p < 0.001$ ; residentes P: 40.0%, N: 20.1%; serviço militar P: 13.3%, N: 2.9%);

#### **4.5. Aplicação dos critérios de selecção de dadores de sangue na amostra estudada**

Considerando os critérios de selecção de dadores de sangue relativamente a malária, preconizados no DL 267/2007 de 24 de Julho e na Circular Normativa N° 001/CN-IPST, IP/12 de 05.07.2012 do Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP, e considerando que a data de colheita de dados corresponderia a uma triagem de dadores de sangue, verifica-se o seguinte na amostra estudada:

**a) Indivíduos que viveram numa zona com malária durante os cinco primeiros anos de vida:**

- Dos 59 participantes no estudo com idade igual ou inferior a 65 anos, que nasceram em países endémicos para malária e não residem actualmente nestes países, 71.2% (42/59) tiveram a sua última visita a zona endémica mais de três anos antes de participarem no estudo; desta forma, 14.8% (42/284) do total de potenciais dadores de sangue seriam aprovados segundo este critério;

- Dos 49 indivíduos com idade igual ou inferior a 65 anos, que nasceram em zona endémica, não residem actualmente nestes países e regressaram da sua última estadia em zona endémica há mais de quatro meses, 79.6% (39/49) têm serologia negativa para *Plasmodium*; assim, 13.7% (39/284) do total de potenciais dadores de sangue seriam aprovados por este critério.

**b) Indivíduos com antecedentes de malária:**

- Dos 41 elementos do estudo com idade igual ou inferior a 65 anos, que tiveram malária, não residem actualmente em zona endémica de malária e regressaram há mais de três anos, 70.7% (29/41) têm serologia negativa para *Plasmodium*, correspondendo a 9.6% (29/301 com idade  $\leq 65$  anos) de potenciais dadores de sangue aprovados.

**c) Visitantes assintomáticos de zonas endémicas:**

Dos participantes no estudo com idade igual ou inferior a 65 anos e que não nasceram nem residem actualmente em zona endémica (n=225), consideraram-se o grupo de visitantes com estadias até seis meses, e o grupo de visitantes com estadias até um ano na sua última viagem.

Considerando “visitante” quem tem estadias até seis meses:

- 56.0% (126/225) dos indivíduos tinham uma última estadia curta e inferior a 6 meses e tinham regressado mais de 6 meses antes do início do estudo, correspondendo a uma aprovação de 41.9% de potenciais doadores de sangue (126/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos); tinham regressado menos de 6 meses antes do início do estudo e seriam suspensos da dádiva 31.9% de potenciais doadores de sangue (96/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos);

- 51.1% (115/225) dos indivíduos tinham uma última estadia inferior a 6 meses e tinham regressado mais de um ano antes do início do estudo, correspondendo a uma aprovação de 38.2% de potenciais doadores de sangue (115/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos); tinham regressado menos de um ano antes do início do estudo e seriam suspensos da dádiva 35.2% de potenciais doadores de sangue (106/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos);

- 76.0% (171/225) dos indivíduos tinham uma última estadia inferior a 6 meses e tinham serologia negativa para *Plasmodium*, correspondendo a uma aprovação de 56.8% de potenciais doadores de sangue (171/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos); os que tinham uma última estadia inferior a 6 meses e apresentavam serologia positiva seriam suspensos da dádiva de sangue (correspondem a 1.6%, 5/301, de inscritos com idade  $\leq 65$  anos);

- 59.5% (134/225) dos indivíduos tinham uma última estadia inferior a 6 meses, tinham regressado mais de 4 meses antes do início do estudo, e tinham serologia negativa para *Plasmodium*, correspondendo a uma aprovação de 44,5% de potenciais doadores de sangue (134/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos);

indivíduos que regressaram menos de 4 meses antes do início do estudo ou regressaram há mais de 4 meses mas têm serologia positiva seriam suspensos da dádiva de sangue (correspondem a 28.9%, 87/301, de inscritos com idade  $\leq 65$  anos);

Considerando “visitante” quem tem estadias até um ano:

- 55.1% (124/225) dos indivíduos tinham uma última estadia de duração inferior a um ano e tinham regressado mais de 6 meses antes do início do estudo, correspondendo a uma aprovação de 41.2% de potenciais dadores de sangue (124/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos); tinham regressado menos de 6 meses antes do início do estudo e seriam suspensos da dádiva 32.5% de potenciais dadores de sangue (98/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos);

- 52.4% (118/225) dos indivíduos tinham uma última estadia inferior a um ano e tinham regressado mais de um ano antes do início do estudo, correspondendo a uma aprovação de 39.2% de potenciais dadores de sangue (118/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos); tinham regressado menos de um ano antes do início do estudo e seriam suspensos da dádiva 35.8% de potenciais dadores de sangue (108/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos);

- 78.2% (176/225) dos indivíduos tinham uma última estadia inferior a um ano e tinham serologia negativa para *Plasmodium*, correspondendo a uma aprovação de 58.5% de potenciais dadores de sangue (176/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos); os que tinham uma última estadia inferior a um ano e apresentavam serologia positiva seriam suspensos da dádiva de sangue (correspondem a 1.6%, 5/301, de inscritos com idade  $\leq 65$  anos);

- 59.1% (133/225) dos indivíduos tinham uma última estadia inferior a um ano, tinham regressado mais de 4 meses antes do início do estudo, e tinham serologia negativa para *Plasmodium*, correspondendo a uma aprovação de 44.2% de potenciais dadores de sangue (133/301 inscritos com idade  $\leq 65$  anos); indivíduos que regressaram menos de 4 meses antes do início do estudo ou regressaram há mais de 4 meses mas têm serologia positiva seriam suspensos da dádiva de sangue (correspondem a 29.6%, 89/301, de inscritos com idade  $\leq 65$  anos);

**d) Residentes:**

Considerando como residência a permanência num país por um período superior a 6 meses, dos participantes no estudo com idade igual ou inferior a 65 anos, 60.9% (53/87) tiveram a sua última estadia mais de três anos antes do início do estudo, pelo que poderiam ser aprovados para a dádiva de sangue, sendo suspensos para a dádiva 39.1% (34/87). Reduzindo o período pós estadia para quatro meses, tendo serologia negativa, 56.2% (49/87) poderiam ser aceites como dadores, 43.8% (38/87) seriam suspensos para a dádiva de sangue.

Considerando como residência a permanência num país por um período superior a um ano, dos participantes no estudo com idade igual ou inferior a 65 anos, 60.0% (48/80) tiveram a sua última estadia mais de três anos antes do início do estudo, pelo que poderiam ser aprovados para a dádiva de sangue, sendo suspensos para a dádiva 40.0% (32/80). Reduzindo o período pós estadia para quatro meses, tendo serologia negativa, 56.4% (45/80) poderiam ser aceites como dadores, 43.6% (35/80) seriam suspensos para a dádiva de sangue.

## **V. DISCUSSÃO**

Neste estudo utilizou-se uma amostragem não aleatória pois não seria possível estudar toda a população de residentes ou viajantes para zonas endémicas de malária. Tal facto não permite generalizar os resultados para o universo da população de residentes/viajantes a zonas endémicas mas aponta para uma tendência que poderá ser corroborada se o estudo for alargado.

O estudo cumpre os preceitos éticos de investigação, considerando que foi pedido consentimento à Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Lisboa, os participantes foram devidamente esclarecidos, podiam desistir em qualquer momento, assinaram Consentimento Informado e os dados foram anonimizados.

Neste estudo optou-se pela aplicação de um questionário auto-preenchido – a aplicação de um inquérito por entrevista não era exequível tendo em conta que muitos dos participantes foram requisitados num posto de colheita de análises e os técnicos que colaboraram no estudo tinham de continuar as suas tarefas. Após a seleção dos indivíduos para participar no estudo era-lhes entregue o consentimento informado e o questionário, sendo que os questionários preenchidos sem qualquer interferência por parte de quem estava a colher as amostras.

A formulação das questões e os temas abordados foram condicionadas pelos temas que se pretendiam abordar neste estudo. Foram utilizadas respostas fechadas, de escolha única ou múltipla e perguntas abertas. Na redacção das perguntas foi utilizada uma linguagem simples e adequada ao vocabulário dos potenciais, o questionário foi testado antes do início do estudo.

O questionário é fácil e de resposta rápida de acordo com o ambiente onde foi aplicado.

É importante ressaltar que neste tipo de estudo poderá existir um viés introduzido pelos lapsos memória (as questões implicavam recordar viagens, história de malária e prevenção realizada ao longo de toda a vida dos participantes).

A metodologia laboratorial utilizada foi a determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp a todas as amostras colhidas aos participantes no estudo, através do kit comercial Malaria EIA KIT TEST KIT. Foi este o teste escolhido visto ser o teste utilizado no IPST,IP e um dos objectivos deste trabalho era obter uma taxa de aprovação dos dadores de sangue consoante fossem utilizados critérios clínicos ou laboratoriais de seleção de dadores de sangue, considerando que os participantes no estudo eram potenciais dadores.

Seed 2010, testou o Newmarket malaria EIA que utiliza antigénios recombinantes de *P. falciparum* e *P. vivax* (teste da mesma casa comercial do utilizado neste estudo) e obteve sensibilidade >98% para *P. falciparum* e 85% para *P. vivax* e estimou uma especificidade de 100%,<sup>90</sup> concluindo que em banco de sangue faz sentido aguardar 4 meses após a exposição para superar o período janela e assim eliminar os possíveis falsos negativos. No entanto, quer o DL 267/2007 quer a circular normativa nº 001/CN-IPST,IP/12 não se referem a este período no que respeita aos visitantes assintomáticos.

Seed 2005, afirma que estudos anteriores mostram que indivíduos semi-imunes têm baixas parasitémia (por vezes indetectáveis) mas elevados títulos de anticorpos, por este motivo um teste de pesquisa de anticorpos seria uma boa escolha para um banco de sangue.<sup>89</sup>

Num estudo apresentado por Elghouzzi 2008, que compara especificidades e sensibilidades de dois testes de ELISA versus IFA, apresentou os seguintes resultados: DiaMed ELISA sensibilidade 93,1% e especificidade 96,7%; Newmarket malaria EIA sensibilidade 82,6%.<sup>40</sup>

Todas as amostras que apresentaram serologia positiva para anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp foram também testadas para PCR para identificação de *Plasmodium* spp e *Plasmodium falciparum*. O PCR, segundo Seed 2005, é a técnica mais sensível dos métodos de diagnóstico directo de malária.<sup>91</sup>

Segundo Hassanpour 2011, o melhor método para minimizar o risco de transmissão de malária por meio de transfusão de sangue é associar os critérios de selecção de dadores com técnicas de PCR e outros métodos laboratoriais.<sup>51</sup>

Participaram no estudo 312 indivíduos, apresentavam uma média de idades de 40.59 anos, apenas um terço é do género feminino, 75% dos inquiridos tem menos de 50 anos, (o que corresponde a uma população tendencialmente na idade activa), a maioria tem grau de escolaridade licenciado ou superior e três quartos nasceram em Portugal. Este seria o tipo população que se esperaria encontrar visto que a maior parte dos participantes eram indivíduos que estavam a fazer análises no âmbito da medicina do trabalho ou jovens que participaram em missões de voluntariado.

Os principais motivos das viagens/estadias em zonas endémicas são: residência, voluntariado, férias e trabalho; e os principais destinos são: Angola, Moçambique e São Tomé e Príncipe. Tal deve-se, provavelmente, devido ao facto de haver muitas empresas em Portugal que se estão a expandir para países africanos, e pela comunidade de origem africana a residir em Portugal.

Consta-se que em relação aos conhecimentos sobre malária, a quase totalidade dos respondentes sabe que a malária se transmite por picada de mosquito, mas metade pensa que a transmissão pode ser feita por meio de águas e alimentos contaminados (tabela 9). Os indivíduos que tiveram história de malária apresentam percentagens superiores de respostas correctas às questões relacionadas com as formas de transmissão da malária (tabela 10), o mesmo acontece com os indivíduos com mais habilitações literárias e com mais viagens (tabela 11). Estes aspectos sugerem que os indivíduos mais informados sobre a doença são os mais viajados, os que já tiveram malária e os que têm mais escolaridade, mas tendo em conta que metade dos inquiridos pensa que a malária se pode transmitir por meio de água e alimentos contaminados é importante apostar num maior esclarecimento destes viajantes.

No que respeita á forma de prevenção da malária a quase totalidade dos respondentes respondeu correctamente a estas questões (medicação adequada e evitar a picada do mosquito), apenas metade dos respondentes afirmam que a prevenção não pode ser feita evitando o consumo de águas e alimentos contaminados e em relação à vacinação como forma de prevenção há um numero igual de respondentes que responde sim e não (tabela 12), o que demonstra que há alguma confusão em relação às vacinas e outros tipos de cuidados que devem ter quando viajam. De forma semelhante ao descrito em relação aos conhecimentos sobre transmissão, tem maior conhecimento sobre prevenção quem, tendencialmente, tem menos idade, tem mais habilitações literárias e mais do que uma viagem (tabela 14), pois, certamente, são indivíduos com mais facilidade de acesso à informação.

Sobre o período de incubação e quadro clínico inicial da malária, apenas dois quintos sabem que os sintomas podem começar após uma semana de estadia na zona endémica, metade dos participantes desconhece o período de incubação da doença enquanto que a maioria (quatro quintos) sabe que os sintomas se podem confundir com sintomas de gripe (tabela 15). Não foi encontrada relação estatisticamente significativa entre os conhecimentos citados e a idade, sexo, habilitações literárias e facto de ter tido história de malária. Apenas apresentam respostas tendencialmente mais correctas quem fez mais viagens – o estudo de uma amostra diferente de viajantes poderia levar à obtenção de outras relações entre variáveis com significância estatística.

Em resumo tem, tendencialmente, mais conhecimentos sobre as formas de transmissão, prevenção, período de incubação e quadro clínico da malária quem: já teve história de malária, tem mais habilitações literárias, faz mais viagens e tem menos idade.

Nenhum dos participantes no estudo apresentava sintomas sugestivos de malária ou estava doente, são indivíduos considerados saudáveis que estavam a fazer análises de rotina para fins de medicina no trabalho ou tinham sido voluntários/missionários em zona endémica de malária.

As amostras colhidas de todos os participantes no estudo foram sujeitas à determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp. pela técnica de ELISA (MALARIA EIA KIT TESTE), destes apenas 31 apresentaram serologia positiva. Estas 31 amostras foram submetidas a uma técnica de PCR para identificação de *Plasmodium* spp e *Plasmodium falciparum* – todas foram negativas, provavelmente devido à não existência de parasitas circulantes.

Em relação aos indivíduos com serologia positiva:

- Os indivíduos que nasceram e viveram durante alguns anos em zonas endémicas, dizem não ter tido história de malária, regressaram a Portugal há mais de quatro anos e apresentavam serologia positiva para *Plasmodium spp*, quando determinado por ELISA (MALARIA EIA KIT TEST), e PCR negativo, podem ter tido contacto com o parasita sem apresentarem sintomatologia grave (podem ser portadores de algum polimorfismo genético que lhes confere alguma resistência à doença)<sup>84</sup>, devido ao viés causado pela memória (terem esquecido de mencionar esse facto por já ter passado muito tempo).
  - Dois indivíduos portugueses que fizeram apenas uma viagem há aproximadamente quatro anos, afirmam não ter tido malária, um não fez qualquer prevenção e o outro utilizou mosquiteiro e repelente, mas apresentam serologia positiva para *Plasmodium spp*, quando determinado por ELISA (MALARIA EIA KIT TEST), e PCR negativo. Estes indivíduos podem ter feito quimioprofilaxia e não se recordarem no momento do questionário. Segundo um estudo realizado por Jelinek (1998) a viajantes alemães assintomáticos que cumpriam quimioprofilaxia prescrita, verificou-se que 4,9% dos viajantes apresentavam um título positivo de anticorpos anti-circumesporozoito.<sup>55</sup>
- Um destes indivíduos apresenta a reactividade serológica próxima do valor de *cut-off* o que poderá corresponder a um falso positivo.

- Um indivíduo natural de Angola, desconhece se teve doença, regressou um mês e meio antes do estudo, faz medicação como medida preventiva e apresenta serologia positiva para *Plasmodium spp*, quando determinado por ELISA (MALARIA EIA KIT TEST), e PCR negativo. Este indivíduo poderá ter sido infectado em algum momento da vida mas não valorizou os sintomas, a medicação profilática que faz não impede que seja infectado havendo desenvolvimento de anticorpos. No momento do estudo já não havia parasitas em circulação, quando verificados por PCR, mas existiam anticorpos que lhe, provavelmente, conferem imunidade (DO elevada).
- Dos indivíduos que são residentes em países endémicos de malária, todos tinham regressado há menos de um mês antes do estudo, a maioria referiu não fazer qualquer medida de prevenção da malária, mas apresentam serologia positiva para *Plasmodium spp*, quando determinado por ELISA (MALARIA EIA KIT TEST), e PCR negativo. Estes indivíduos são os prováveis semi-imunes: indivíduos que estão em constante contacto com o parasita existindo um equilíbrio entre o parasita e o sistema imunitário<sup>66</sup>, mas que no momento do estudo não apresentavam parasitas em circulação ou poderiam estar em tão baixo nível que não fossem detectados pelo PCR. Esta evidência parece ser corroborada pelo que afirma Olesen 2010, a imunidade natural contra a malária é mais forte em indivíduos adultos residentes em áreas endémicas, foi desenvolvida durante um longo período e por sucessivas exposições, confere imunidade.<sup>78</sup> São estes indivíduos que podem causar maior risco de transmissão de malária por via transfusional, segundo Seed 2010.<sup>90</sup>

- Dos indivíduos que mencionam ter tido história de malária no passado (a maioria há cerca de trinta anos), regressaram de zonas endémicas há mais de três anos, e interessantemente apresentam serologia positiva para *Plasmodium spp*, quando determinado por ELISA (MALARIA EIA KIT TEST), e PCR negativo. Estes dados mostram que mesmo muitos anos após uma crise de malária ou a saída de zona endémica ainda podem ser detectado um título de anticorpos elevado, ou eventualmente podem haver limitações do teste utilizado para indivíduos com estas características.
- Os indivíduos que regressaram há menos dois anos e todos com história de malária, apresentam serologia positiva para *Plasmodium spp*, quando determinado por ELISA (MALARIA EIA KIT TEST), e PCR negativo, tiveram contacto com o parasita, desenvolveram doença e neste momento apresentam anticorpos que provavelmente lhes conferem imunidade.

Há indivíduos que apesar de afirmarem que tiveram antecedentes de malária, quando sujeitos à técnica de ELISA (MALARIA EIA KIT TEST) apresentam serologia negativa, isto pode dever-se a viés de memória, doença mal diagnosticada ou devido a problemas inerentes ao ensaio utilizado (antígenos recombinantes utilizados no kit não reconhecerem os anticorpos presentes no plasma), outra possível explicação é porque ao longo há uma tendência para descer o título de anticorpos se não houver mais exposições, podendo tornar-se indetectáveis.

Ao cruzar as variáveis história de malária e serologia positiva para anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp, com variáveis características das viagens/estadias, constata-se que os indivíduos sem história de malária mas com serologia positiva são, tendencialmente, os indivíduos naturais de zonas endémicas, regressados a Portugal há mais de três anos e com duração da viagem/estadia superior a um ano, podendo especular-se que estes casos são situações em que o indivíduo não se recorda da doença.

Quando se cruzaram as seguintes variáveis: país de nascimento, duração de viagem/estadia em zona endémica e motivo da viagem/estadia com a variável serologia positiva ou negativa para anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp, verifica-se que quem apresenta serologia positiva são principalmente os nascidos em zona endémica, com estadias com maior duração e os residentes – estes dados parecem vir ao encontro do que é dito por Rogier 2003.<sup>84</sup>

Tendo em conta os critérios de selecção de dadores de sangue relativamente a malária, preconizados no DL 267/2007 de 24 de Julho e na Circular Normativa Nº 001/CN-IPST, IP/12 de 05.07.2012 do Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP, e considerando que a data de colheita de dados corresponderia a uma triagem de dadores de sangue, podemos constatar o seguinte:

- a) **Indivíduos que viveram em zona endémica de malária durante os cinco primeiros anos de vida:** quando aplicados apenas os critérios clínicos, nesta amostragem, são aprovados 14,8% dos indivíduos, mas quando é feito o teste serológico e há a redução do tempo de suspensão são aprovados apenas 13,7% dos indivíduos.
- b) **Indivíduos com antecedentes de malária:** independentemente da aplicação do teste serológico seriam aprovados 9,6% indivíduos, desta amostragem.

c) **Visitantes assintomáticos de zonas endémicas de malária:** independentemente

de ser considerado visitante com estadia de duração de seis meses ou um ano,

- regresso há mais de seis meses: 41% aprovados, 32% suspensos

- regresso há mais de um ano: 38% aprovados, 35% suspensos

- regresso há mais de quatro meses e serologia negativa: aprovados 44% aprovados, 29% suspensos

- só efectuada serologia: 58,5% aprovados, 1,6% suspensos

Os critérios que permitem uma maior taxa de aprovação são os que aceitam dadores de sangue que regressaram de zonas endémicas de malária, fazendo apenas um teste serológicos independentemente da data de regresso, quando a literatura recomenda pelo menos quatro meses de suspensão.<sup>90</sup>

d) **Indivíduos com antecedentes de afecção febril, não diagnosticada, durante**

**uma visita a uma zona endémica ou durante seis meses após essa visita:** este grupo de indivíduos não foi estudado, porque um dos critério para participar neste estudo é ser saudável no momento em que participa no estudo.

e) **Residentes:** independentemente de ser considerado como residência estadia por

um período igual ou superior a seis meses ou por um período igual ou superior a um ano; quando são aplicados apenas os critérios clínicos obtém-se uma taxa de aprovação de 60% e de suspensão de 40%, mas quando é feito o teste serológico e há a redução do tempo de suspensão são aprovados apenas 56% e suspensos 44%.

De uma forma geral, quando se conjuga a aplicação de um teste serológico negativo com uma redução do tempo de suspensão há um aumento da taxa de suspensão de doadores de sangue, se esta amostragem fosse considerada como possíveis doadores de sangue. Quatro meses após o regresso de zona endémica, os indivíduos ainda têm título de anticorpos detectável.

## VI. CONCLUSÕES

Para a realização deste estudo foi utilizada uma amostragem não aleatória, porque não seria possível estudar toda a população de residentes ou viajantes para zona endémicas de malária. Devido a esse facto não é possível generalizar os resultados, mas o estudo aponta para uma tendência que pode ser corroborada se o estudo for alargado.

É importante referir que neste tipo de estudos pode haver um viés introduzido pelos lapsos de memória.

Os principais motivos das viagens/estadias em zonas endémicas são: residência, voluntariado, férias e trabalho; e os principais destinos são: Angola, Moçambique e São Tomé e Príncipe. Tal deve-se, provavelmente, devido ao facto de haver muitas empresas em Portugal que se estão a expandir para países africanos, e pela comunidade de origem africana a residir em Portugal.

Os indivíduos mais informados sobre a doença são os mais viajados, os que já tiveram malária e os que têm mais escolaridade, mas tendo em conta que metade dos inquiridos pensa que a malária se pode transmitir por meio de água e alimentos contaminados é importante apostar num maior esclarecimento destes viajantes.

Tem maior conhecimento sobre prevenção os indivíduos que, tendencialmente, têm menos idade, têm mais habilitações literárias e mais do que uma viagem, pois, certamente, são indivíduos com mais facilidade de acesso à informação.

Têm, tendencialmente, mais conhecimentos sobre as formas de transmissão, prevenção, período de incubação e quadro clínico da malária quem: já teve história de malária, tem mais habilitações literárias, faz mais viagens e tem menos idade.

A metodologia laboratorial utilizada foi a determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp, a todas as amostras colhidas aos participantes no estudo, através do kit comercial Malária EIA KIT TEST. Este foi o teste escolhido visto ser o aplicado no IPST,IP e um dos objectivos do estudo é avaliar a taxa de aprovação de dadores de sangue em Portugal, comparando critérios clínicos e critérios serológicos.

Participaram no estudo 312 indivíduos, apenas 31 apresentaram resultados positivos para serologia para *Plasmodium* spp, e todas estas amostras quando sujeitas a PCR para identificação de *Plasmodium* spp e *P. falciparum* deram resultado negativo.

Ao cruzar as variáveis história de malária e serologia positiva para anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp, com variáveis características das viagens/estadias, constata-se que os indivíduos sem história de malária mas com serologia positiva são, tendencialmente, os indivíduos naturais de zonas endémicas, regressados a Portugal há mais de três anos e com duração da viagem/estadia superior a um ano, podendo especular-se que estes casos são situações em que o indivíduo não se recorda da doença.

Quando se cruzaram as seguintes variáveis: país de nascimento, duração de viagem/estadia em zona endémica e motivo da viagem/estadia com a variável serologia positiva ou negativa para anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp, verifica-se que quem apresenta serologia positiva são principalmente os nascidos em zona endémica, com estadias com maior duração e os residentes.

Tendo em conta os critérios de selecção de dadores de sangue relativamente a malária, preconizados no DL 267/2007 de 24 de Julho e na Circular Normativa Nº 001/CN-IPST, IP/12 de 05.07.2012 do Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP, e considerando que a data de colheita de dados corresponderia a uma triagem de dadores de sangue, podemos concluir que, contrariamente ao esperado a redução do tempo de suspensão dos dadores conjugado com um resultado serológico negativo não aumenta a taxa de aprovação de dadores de sangue.

## VII. REFERÊNCIAS

1. Abbas A.K., Lichtman A.H. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier.2005; 5:370-376
2. *Acções de Controle da Malária. Manual para profissionais de saúde na tenção básica*. 2005. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF
3. Allison A.C. Genetic control of resistance to human malaria. *Current Opin Immunology*. 2009; 21:499-505
4. Almeida A., Galão R., Sousa C., Novo M., Pinto J., Esteves A., Potential mosquito vectors of arboviroses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008. 102(8): 823-832
5. Akhtar S., Maimoon S., Wilkinson A., Gowardhan V., Mahore S. Feasible choices in diagnostic methods of malaria. *Journal of Vector Borne Diseases*. 2010; 47: 151-154
6. Amino R., Thiberge S., Martin B., Celli S., Shorte S., Frischknecht F., Ménard R., Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*. 2006. 12: 220-224
7. Arnáez J., Roa M.A., Albert L., Cogollos R., Rubio J.M., Villares R., Abdulkarrem A, et al. Imported malaria in children: a comparative study between recente immigrants and immigrant travelers. *Journal travel medicine*. 2010. 17 (4): 221-227
8. Arruda M.E., Zimmerman R.H., Souza RMC, Oliveira-Ferreira J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007; 102: 367-371
9. Associação portuguesa de Imuno-Hemoterapia. Citado em <http://www.apih.eu/>

10. Aucan C., Traore Y., Tall F., Nacro B., Traore-Leroux T., Fumoux F., Rihet P. High IgG2 and low IgG4 levels are associated with human resistance to *P. falciparum* malaria. *Infection and Immunity*. 2000. 68: 1251-1258.
11. Baird J. K. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*. 1995. 11: 105-111.
12. Baird J. Malaria zoonoses. *Travel Medicine and Infectious Diseases*. 2009. 7: 269-277
13. Beeson J. G., Osier F. H., Engwerda C. R. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends Parasitology*. 2008. 24: 578-584.
14. Bell D., Wongsrichanalai C., Barnwell J. W. Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved? *Nature Reviews Microbiology*. 2006; 4: 682-695.
15. Bouharoun-Tayoun H., Oeuvray C., Lunel F., Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *The Journal of Experimental Medicine*. 1995 182: 409-418.
16. Bruce-Chwatt L., Zulueta J., *Sezonismo*. Lisboa: Ministério dos Assuntos Sociais. 1980
17. Castro L, Cardoso A.I., Queirós L., Gonçalves G., *Malária na região norte de Portugal (1993-2002) caracterização epidemiológica*. *Acta médica portuguesa*. 2004. 17: 291-298
18. Caumes, E (2002) *Health and Travel*. Ed. Aventis Pasteur, MSD.
19. CDC. Travelers'Health – Yellow Book 2012 . Disponível em [wwwnc.cdc.gov/travel/](http://wwwnc.cdc.gov/travel/)
20. Chiodini P.L., Hartley S., Hewitt P.E., Barbara J.A.J., Lallo K., Bligh J., Voller A. Evaluation of a malaria antibody ELISA and its value in reducing potential wastage of

red cell donations from blood donors exposed to malaria, with a note on a case of transfusion-transmitted malaria. *Vox sanguinis*. 1997; 73: 143-148

21. Cnops L., Jacobs J., Esbroeck M.V. Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed plasmodium infections. *Clinical microbiology and infection*. 2010

22. Cohen S., McGregor I. A., Carrington S. Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 1962. 192: 733-737.

23. Coosemans M., Van Gompel A., (1998) Les principaux arthropodes vecteurs de maladies. Quels risques pour le voyageur d'être piqué? D'être contaminé? *Bulletin of the exotict pathology society*. 91(5-5 bis) :467-473.

24. Corram P., Coleman P., Riley E., Drakeley C. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trend in parasitology*. 2007; Vol.23, No.12

25. Cox-Singh J., Davis T.M.E., Lee K.S., Shasul S.S.G., Matusop A., Ratnam S., Rahman H.A., Conway D.J., Singh B. Plasmodium knowlesi malaria in human is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46:165-171

26. Crompton P. D., Pierce S. K., Miller L. H. Advances and challenges in malaria vaccine development. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010. 120(12): 4168-4178.

27. Danis K., Baka A., Lenglet A., Van Bortel W., Terzaki I., Tseroni M. Autochthonous Plasmodium vivax malaria in Greece, 2011. *Eurosurveillance*. 2011: Vol.16

28. Decreto-Lei nº 267/2007 de 24 Julho

29. DGS-DSEES- Elementos estatísticos informação geral de saúde / 2008 ISSN 0872-1114. Citado em [www.dgs-dsees](http://www.dgs-dsees)

30. Dia A., Gautret P., Adheossi E., Bienaimé A., Gaillard C., Simon F., Parola P., et al., Illness in French Travelers to Senegal: prospective cohort follow-up and sentinela surveillance data. *Journal of travel medicine*. 2010. 17(5): 296-302
31. Doderer C., Heschung A., Guntz P., Cazenave J.P., Hasmann Y., Senegas A. A new ELISA kit which use a combination of Plasmodium falciparum extract and recombinant Plasmodium vivax as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. *Malaria journal*. 2007; 6: 19
32. Doenças de declaração obrigatória 2002-2006 regiões e sub-regiões de saúde no continente e regiões autónomas. Citado em [www.dgs.pt](http://www.dgs.pt)
33. Doolan D. L., Dobaño C., Baird J.K. Acquired immunity to malaria. 2009. *Clinical Microbiology Review* 22: 13-36.
34. Doolan D. L., Martinez-Alier N. Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Current Molecular Medicine*. 2006. 6: 169-185.
35. D'Ortenzio E., Sissoko D., Dehecq J.S., Renault P., Filleul L., Malaria imported into Réunion Island: is there a risk of re-emergence of the disease?. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010.104:251-254
37. Druilhe, P., Khusmith, S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of Plasmodium falciparum and malaria-immune status. *Infection and Immunity*.1987; 55: 888-891.
38. Druilhe P., Perignon J. L. Mechanisms of defence against Plasmodium falciparum asexual blood stages in humans. *Immunology Letters*. 1994. 41: 115-120.
39. Dvorak J.A., Miller L.H., Whitehouse W.C., Shiroishi T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science*. 1975; 187: 748-750

40. Elghouzzi M.H., Senegas A., Steinmetz T., Guntz P., Barlet V., Assal A. Multicentric evaluation of the DiaMed enzyme-linked immunosorbent assay malaria antibody test for screening of blood donors for malaria. *Vox sanguinis*. 2008; 94: 33-40
41. Engwerda C. R., Good M. F. Interactions between malaria parasites and the host immune system. *Current Opinion in Immunology*. 2005. 17: 381-387.
42. Figtree M., Lee R., Bain L., Kennedy T., Mackertich S., Urban M., et al. *Plasmodium knowlesi* in human Indonesian Borneo. *Emerging Infectious Diseases*. 2010. 16(4): 672-674
43. Freedman D.O., Malaria prevention in short-term travelers. *The new England journal of medicine*. 2008. 359: 603-612
44. Fontain A, Pophillat M, Bourdon S, Villard C, Belghazi M, Fourquet P. Specific antibody responses against membrane proteins of erythrocytes infected by *Plasmodium falciparum* of individual briefly exposed to malaria. *Malaria journal*. 2010; 9: 276
45. Fuertes P. Z., Pérez-Ayala A., Molina J. A. P., Norman F. F., Monge-Maíllo B. B., Navarro M., et al. Clinical and epidemiological characteristics of imported infectious diseases in spanish travelers. *Journal of travel medicine*. 2010. 17 (5): 303-309
46. Garraud O., Andreu G., Elghouzzi M.-H., Laperche S., Lefrère J.-J., Measures to prevent transfusion-associated protozoal infection in non-endemic countries. *Travel medicine and infectious disease*. 2007. 5: 110-112
47. Garraud O., Assal A., Pelletier B., Danic B., Kerleguer A., David B., et al. Overview of revised measures to prevent malaria transmission by blood transfusion in France. *Vox sanguinis*. 2008. 95: 226-231

48. Gautret P., Schlagenhauf P., Gaudart J., Castelli F., Brouqui P., Sonnenburg F., et al. Multicenter EuroTravNet/GeoSentinel study of travel-related infectious diseases in Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2009.15(11): 1783-1790
49. Guedes S., Siikamaki H., Kantele A., Lyytikainen O., Imported malaria in Finland 1995 to 2008: an overview of surveillance, travel trends, and antimalarial drug sales. *Journal of travel medicine*. 2010. 17(6): 400-404
50. Gupta S, Snow RW, Donnelly C A, Marsh K, Newbold, C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nature Medicine*.1999. 5: 340-343.
51. Hassanpour G, Mohebbali M, Raeisi A, Abolghasemi H, Zeraati H, Alipour M, Azizi E, Keshavarz H. Detection of malaria infection in blood transfusion: a comparative study among real-time PCR, rapid diagnostic tests and microscopy. *Parasitology Research*. 2011;108: 1519-1523
52. Howard, R. J., Uni, S., Aikawa, M., Aley, S. B., Leech, J. H., Lew, A. M, Wellems, T. E., Renner, J., Taylor, D. W. Secretion of a malaria histidine-rich protein (Pf HRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *The Journal Cell Biology*. 1986; 103(4): 1269-77.
53. Instruction Manual. MALARIA EIA TEST KITS - BioRad.
54. Jain S., Persaud D., Perl T., Pass M., Murphy K., Pisciotta J., et al. Nosocomial malaria and saline flush. *Emerging Infectious Diseases*.2005. 11(7): 1097-1099
55. Jelinek T, Bluml A, Loscher T, Nothdurft HD, Assessing the incidence of infection with *Plasmodium falciparum* among international travelers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998; 59:35-37

56. Kain, K. C., Keystone, J. S. Malaria in travelers. *Epidemiology, disease and prevention. Infectious Disease Clinical North America.* 1998. 12: 267.
57. Kitchen AD, Barbara JAJ, Hewit PE. Documented cases of post-transfusion malaria occurring in England: a review in relation to current and proposed donor-selection guidelines. *Vox sanguinis.* 2005; 89: 77-80
58. Kitchen A.D., Chiodini P.L., Malaria and blood transfusion. *Vox sanguinis.* 2006. 90: 77-84
59. Kitchen AD, Lowe PHJ, Lallo K, Chiodini PL. Evaluation of a malarial antibody assay for use in the screening of blood and tissue products for clinical use. *Vox sanguinis.* 2004; 87: 150-155
60. Kochar D., Saxena V., Singh N., Kochar S., Kumar S., Das A., Plasmodium vivax Malaria. *Emerging Infectious Diseases.* 2005.11 (1): 132-134
61. Krishna K, Martin D, Lau R, Ralevski F, Pillai DR. Multiplex real-time quantitative PCR, microscopy and rapid diagnostic immune-chromatographic tests for the detection of Plasmodium spp: performance, limit of detection analysis and quality assurance. *Malaria journal.* 2009; 8:284
62. Krotoski, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1985. 79(1):1-11.
63. Krotoski WA. The hypnozoite and malarial relapse. *Prog Clin Parasitol.* 1989; 1:1-19
64. Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *American Journal Human Genetics.* 2005; 77: 171-192

65. Langhorne J, Ndungu FM., Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology*. 2008 9: 725-732.
66. Leiby D.A., Making sense of malaria. *Transfusion*. 2007. 47: 1573-1577
67. Leoratti FMS, Durlacher RR, Lacerda MVG, Alecrim MG, Ferreira AW, Sanchez MCA, Moraes SL. Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malaria journal*. 2008; 7:186
68. Levesques MC, Hobbs MR, Anstey MN, Vaughn TN, Chancellor JA, Pole A, Perkins D.J. et al. Nitric oxide synthase type 2 promoter polymorphisms, nitric oxide production, and disease severity in Tanzanian children with malaria. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999. 180: 1994-2002.
69. Luzzatto L. Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood*. 1979; 54: 961-976
70. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunology*. 2006. 28: 51-60.
71. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenicity of basic malaria. *Nature*. 2002; 415:637-679
72. Ministério da Saúde do Brasil. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. 2005
73. Miranda SO, Gerald N, McCutchan T, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends and parasitology*. 2011; 27: 442-449
74. Mirzaian E., Durham M.J., Hess K., Goad J.A., Mosquito-borne illnesses in travelers: a review of risk and prevention. *Pharmacotherapy*. 2010. 30 (10):1031-1043
75. Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Rodríguez, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*. 2001. 5, 291 (5501): 141-4.

76. Neuberger A., Klement E., Reyes C.M.G., Stamler A., A cohort study of risk factors for malaria among healthcare workers in equatorial Guinea: stay away from the ground floor. *Journal of travel medicine*. 2010. 17(5): 339-345
77. Oh Js, Kim JS, Lee CH, Nam DH, Kim SH, Park DW, Lee CK, Lim CS, Park GH. Evaluation of a malaria antibody enzyme immunoassay for use in blood screening. *Memoria do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008
78. Olesen CH, Brahim K, Vandahl B, Lousada-Dietrich S, Jogdand PS, Vestergaard LS, Dodoo D, Hojrup P, Christiansen M, Larsen SO, Singh S, Theisen M. Distinct patterns of blood-stage parasite antigens detected by plasma IgG subclasses from individuals with different level of exposure to *Plasmodium falciparum* infection. *Malaria journal*. 2010;9: 296
79. Plebanski M, Hill A V S. The immunology of malaria infection. *Current Opinion in Immunology*. 2002. 12: 437-441.
80. Perlmann P, Perlmann H, Berzins K, Troye-Blomberg M. Selected problems of malaria blood stage immunity. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 1998. 23: 55-62.
81. Prudencio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousand of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Rev Microb*. 2006; 4:849-856
82. Reesink H.W., European strategies against the parasite transfusion risk. *Transfusion Clinique et biologique*. 2005. 12: 1-4
83. Rodrigues A. *Malaria e Babesiose*. Faculdade de medicina da universidade do Porto. 2007
84. Rogier C. Paludisme de l'enfant en zone d'endemie: epidemiologie, acquisition d'une immunité et strategies de lutte. *Médecine tropicale*. 2003; 63: 449-464

85. Roll back malaria. Global malaria action plan. Disponivel em [www.rbm.who.int](http://www.rbm.who.int)
86. Romi R., Boccolini D., D'Amato S., Cenci C., Peragallo M., D'Ancona F., et al. Incidence of malaria and risk factors in Italian travelers to malaria endemic countries. *Travel medicine and infectious disease*. 2010. 8: 144-154
87. Rowe A, Obeiro J, Newbold CI, Marsh K. Plasmodium falciparum resetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infection and Immunity*. 1995. Vol 63, No 6: 2323-2326
88. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, Foucault C, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991;45: 297-308.
89. Seed CR, Cheng A, Davis TME, Bolton WV, Keller AJ, Kitchen A, Cobain TJ. The efficacy of a malarial antibody enzyme immunoassay for establishing the reinstatement status of blood donors potentially exposed to malaria. *Vox sanguinis*. 2005; 88:98-106
90. Seed CR, Kee G, Wong T, Law M, Ismay S. Assessing the safety and efficacy of a test-based, targeted donor screening to minimize transfusion transmitted malaria. *Vox sanguinis*. 2010; 98: 182-192
91. Seed CR, Kitchen A, Davis TME. The Current Status and Potential Role of Laboratory Testing to Prevent Transfusion-Transmitted Malaria. *Transfusion Medicine Reviews*. 2005; 19: 229-240
92. Sinha, S., Mishra, S. K., Sharma, S., Patibandla, P. K., Mallick, P. K., Sharma. Et al. Polymorphisms of TNFenhancer and gene for FcgammaRIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. *Malaria Journal*. 2008; 7: 13.

93. Spencer B., Steele W., Custer B., Kleinman S., Cable R., Wilkinson S., Risk for malaria in United States donors deferred for travel to malaria-endemic areas. *Transfusion*. 2009.49: 2335-2345
94. Stefan, H. I. K., Karine, K., Kai, M. The Plasmodium sporozoite journey: a rite of passage. *Parasitology*. 2003. 19 (3)
95. Stephens R, Langhorne J. Priming of CD4+ T cells and development of C4+ T cell memory; lessons for malaria. *Parasite Immunology*. 2006. 28: 25-30.
96. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4:169-180
97. Sturenburg E, Junker R. Point-of care testing in microbiology. *Dtsch Arztebl Int*. 2008; 106: 48-54
98. Tek FB, Dempster AG, Kale I. Computer vision for microscopy diagnosis of malaria. *Malaria journal*. 2009; 8: 153
99. Tuteja, R. Malaria - an overview. *FEBS Journal*. 2007. 274, 4670-4679.
100. Von der Weid T, Honarvar N, Langhorne J. Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. *Journal of Immunology*. 1996; 156: 2510-2516.
101. Von der Weid T, Kitamura D, Rajewsky K, Langhorne J. A dual role for B cells in Plasmodium chabaudi chabaudi (AS) infection? *Research in Immunology*. 1994; 145: 412-419.
102. Weatheral, D. J. L., Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., Doumbo, O.K., Casals-Pascual, C., Roberts, D. J. Malaria and Red Cell Hematology. 2002. 35-57.
103. WHO. International travel and health. 2011. [www.who.int/ith](http://www.who.int/ith)

104. WHO. Severe and complicated malaria. World Health Organisation, communicable diseases cluster. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1990. 84: (Suppl 2) S1-65.
105. WHO. World Malaria Report, 2010. Disponível em <http://www.who.int/whr/2011>
106. WHO. World Malaria Report, 2010. Disponível em <http://www.who.int/ith>
107. White NJ, Breman JG (1998) Malária e outras doenças causadas por hemiparasitas. In: *Harrison. Medicina Interna*. Fauci AS, Braunwald EB, Isselbacher K et al (Eds), 14<sup>a</sup> ed, Mc Graw Hill, Rio de Janeiro, pp 1263-1271.
108. Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, Liewsaree W, Riley EM, Hafalla JCR. Long-lived antibody and B cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Plos pathogens*. 2010. 6
109. Wongsrichanalai, C., Barcus, M. J., Muth, S., Sutamihardja, A., Wernsdorfer, W. H. A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007; 77: 119-127.
110. Yamauchi, L. M., Coppi, A., Snounou, G., Sinnis, P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular Microbiology*. 2007. 9: 1215-1222.

## **ANEXO 1**

## ESTUDO DE MALÁRIA

### CONSENTIMENTO INFORMADO

Etiqueta de identificação da colheita

.....

Declaro que fui informado e autorizei a utilização de uma amostra do meu sangue, para a pesquisa de anticorpos anti – *Plasmodium*.

Fui informado que é um estudo piloto a realizar a quem permaneceu em zonas endémicas de Malária e que não se trata de um estudo obrigatório.

Fui informado que quem realiza o estudo desconhece a identificação do dador.

Fui, ainda informado que, em caso de positividade, serei contactado e enviado a uma consulta para tratamento da doença.

Data:...../...../.....

Assinatura do Dador:.....

Assinatura do Técnico:.....

**ANEXO 2**

## INQUÉRITO A PESSOAS COM ESTADIAS PREVIAS EM ZONAS TROPICAIS

Etiqueta de identificação da colheita

DATA: ...../...../.....

Pretendemos conhecer melhor as pessoas que estiveram em países tropicais de África, América ou Ásia. Por isso, pedimos-lhe que participe no questionário. Por favor, **devolva-o ao Técnico de Saúde** depois de preenchido.

**Este questionário é anónimo.**

1. Quantas viagens ou estadias fez/teve em países com Paludismo ou Malária? \_\_\_\_\_

2. Quando é que fez a última viagem para um desses países? \_\_\_\_\_

3. Alguma vez teve paludismo (malária)?      **Sim**      **Não**

4. Em que países esteve? (viagens ou residência)

**Preencha UM quadro por país ou viagem**

Quadro 1:

<b>a) País</b> _____ <b>Estado</b> _____ <b>Região</b> _____	<b>b) Motivo</b> Residência Trabalho Visita/ Férias Outro. Qual? _____	<b>c) Quanto tempo lá esteve?</b> _____ Dias/ Meses/ Anos (assinale o que interessa)	<b>d) Em que data regressou?</b> ____/____/____ (dia/ mês/ ano)
<b>e) Teve Paludismo (Malária) relacionado com esta estadia?</b>  <b>Não</b> <b>Sim</b> - Há quanto tempo? _____ Dias/Meses/ Anos (assinale o que interessa)			
<b>f) Nesta estadia teve alguns cuidados para evitar contrair Paludismo (Malária)? (Assinale quais)</b>  nenhuns cuidados Mosquiteiro Medicamentos:    Mefloquina    Malarone    Doxiciclina    Resochina    Desconhece Outros. Quais? (especifique) _____ _____ _____			

*Observações que queira acrescentar:* \_\_\_\_\_

**NOTA: se esteve só NUM país ou fez apenas UMA viagem passe para a página seguinte (questão 5)**

Quadro 2:

<b>a) País</b> _____ <b>Estado</b> _____ <b>Região</b> _____	<b>b) Motivo</b> Residência Trabalho Visita/ Férias Outro. Qual? _____	<b>c) Quanto tempo lá esteve?</b> _____ Dias/ Meses/ Anos (assinale o que interessa)	<b>d) Em que data regressou?</b> ____/____/____ (dia/ mês/ ano)
<b>e) Teve Paludismo (Malária) relacionado com esta estadia?</b>  Não Sim - Há quanto tempo? _____ Dias/Meses/ Anos (assinale o que interessa)			
<b>f) Nesta estadia teve alguns cuidados para evitar contrair Paludismo (Malária)? (Assinale quais)</b>  nenhuns cuidados Mosquiteiro Medicamentos: Mefloquina    Malarone    Doxiciclina    Resochina    Desconhece Outros. Quais? (especifique) _____ _____ _____			

Quadro 3:

<b>a) País</b> _____ <b>Estado</b> _____ <b>Região</b> _____	<b>b) Motivo</b> Residência Trabalho Visita/ Férias Outro. Qual? _____	<b>c) Quanto tempo lá esteve?</b> _____ Dias/ Meses/ Anos (assinale o que interessa)	<b>d) Em que data regressou?</b> ____/____/____ (dia/ mês/ ano)
<b>e) Teve Paludismo (Malária) relacionado com esta estadia?</b>  Não Sim - Há quanto tempo? _____ Dias/Meses/ Anos (assinale o que interessa)			
<b>f) Nesta estadia teve alguns cuidados para evitar contrair Paludismo (Malária)? (Assinale quais)</b>  nenhuns cuidados Mosquiteiro Medicamentos: Mefloquina    Malarone    Doxiciclina    Resochina    Desconhece Outros. Quais? (especifique) _____ _____ _____			

**Se fez mais viagens, por favor, peça outro inquérito e complete.**

Assinale *Não / Sim* ou *Não Sabe* em cada uma das opções.

**5. Como é que se pode apanhar Paludismo (Malária)?**

Picada de mosquito	Não	Sim	Não sabe
Consumo de água ou alimentos contaminados	Não	Sim	Não sabe
Contacto sexual	Não	Sim	Não sabe
Outra forma, indique qual: _____			

**6. Como é que se pode evitar o Paludismo (Malária)?**

Medicamentos adequados	Não	Sim	Não sabe
Vacinação	Não	Sim	Não sabe
Evitar picada de mosquito	Não	Sim	Não sabe
Cuidados com consumo de água ou alimentos	Não	Sim	Não sabe
Outra forma, indique qual: _____			

**7. Na maioria dos casos, no início do Paludismo (Malária) os sintomas são idênticos a uma gripe?**

	Não	Sim	Não sabe
--	-----	-----	----------

**8. Os sintomas do Paludismo (Malária) só podem começar a partir de uma semana após ter estado em zona de Paludismo?**

	Não	Sim	Não sabe
--	-----	-----	----------

**9. Caracterização do respondente:**

Sexo	Idade	Habilitações literárias	País em que nasceu?
M	___ anos	até 4º ano (4ª classe)	_____
F		6º ano (ciclo)	
		9º ano (5º ano liceu)	
		12º ano (secundário)	
		licenciatura/ mestrado/ doutoramento	

Observações que pode acrescentar: \_\_\_\_\_

**Muito obrigada pela sua participação.**