

Malária: estudo retrospectivo de casos clínicos suspeitos de infeção por *Plasmodium* sp. (2010-2020)

Malaria: retrospective study of suspected clinical cases of Plasmodium sp. infection (2010-2020)

Tânia Reis, Susana Martins, Idalina Ferreira, Anabela Vilares, Maria João Gargate

m.joao.gargate@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A malária, é uma infeção parasitária causada por um protozoário intracelular obrigatório (género *Plasmodium*), cuja transmissão é assegurada quando uma fêmea de mosquito género *Anopheles* infetada efetua a sua refeição de sangue num indivíduo. Estão descritas mais de 150 espécies, mas apenas cinco infetam o Homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e mais recentemente, *P. knowlesi*, uma espécie que causa malária em macacos no sudeste asiático. É a doença parasitária mais importante para o Homem, encontrando-se infetada cerca de 5% da população mundial, sendo o *P. falciparum* o agente mais disseminado, responsável por mais de 80% dos casos mundiais e o que apresenta uma patogenia mais agressiva. O objetivo deste estudo foi efetuar o diagnóstico laboratorial em doentes com quadro clínico compatível com malária e descrever as características demográficas nos casos confirmados. As metodologias de diagnóstico utilizadas foram, serológicas (IFI), moleculares (PCR em tempo real, adaptada de Swan *et al.* e a pesquisa direta em gota espessa e esfregaço. Foram analisadas 802 amostras, 15 das quais provenientes do surto de ébola (África ocidental, 2014). Detetaram-se 124 (15,5%; 124/802) casos positivos. Todos os casos positivos de malária são importados. A maioria dos casos ocorreu em de viajantes, indivíduos adultos. Pelo facto de a transmissão local continuar a ser possível na Europa e pela quantidade de viagens efetuadas entre a Europa e os países endémicos salienta-se a necessidade de vigilância, e prevenção desta parasitose.

_Abstract

Malaria is a human disease caused by a protozoan infection of red blood cells transmitted by the bite of a female anopheline mosquito. There are described more than 150 species of Plasmodium but only five infected humans, P. falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale and more recently P. knowlesi, a specie that causes malaria in monkeys in Southeast Asia. Malaria is the most important parasitic disease of man; approximately 5% of the world's population is infected. P. falciparum is the most widespread specie responsible for over 80% of cases worldwide and which has a more aggressive pathogenesis. The aim of the study was to perform laboratory diagnosis in patients with clinical symptoms compatible with malaria and describe the demographic characteristics in confirmed cases. The methods of diagnosis used were serological (IIF), molecular (real-time PCR, adapted Swan et al.) and direct visualization of thick and thin blood smears. We analysed 802 specimens, 15 of which belonging to Ebola outbreak (West Africa, 2014). 124 (15.5%; 124/802) were positive cases. All positive cases of malaria are imported. Most cases occurred in adults travellers. Since local transmission continues to be possible in Europe

and the big number of trips between Europe and endemic countries are a reality underlines the need of surveillance and prevention of this disease.

_Introdução

A malária, também designada por paludismo, é uma infeção parasitária causada por um protozoário intracelular obrigatório do género *Plasmodium*, cuja transmissão é assegurada quando uma fêmea de mosquito, pertencente ao género *Anopheles*, infetada efetua a sua refeição de sangue no Homem. O *Plasmodium* sp. pertence ao Filo Apicomplexa, constituído por seres eucariotas unicelulares, que possuem um complexo apical que desempenha um papel fundamental na entrada nas células hospedeiras e à Família *Plasmodiidae* caracterizada por apresentar dois tipos de multiplicação no seu ciclo de vida: uma assexuada (Homem) e outra sexuada (mosquito) (1). O ciclo de vida do *Plasmodium* pode ser dividido em três estádios, a fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado – mosquito – (ciclo esporogónico) e duas fases assexuadas que ocorrem no Homem: o ciclo exoeritrocítico ou hepático (fígado) e o ciclo eritrocítico (glóbulos vermelhos) (2).

Estão atualmente identificadas cerca de 150 espécies de *Plasmodium*, mas apenas cinco infetam o Homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Esta última é uma espécie causadora de malária em macacos no sudeste asiático e foi identificada com sendo patogénica para humanos (1).

A malária constitui, atualmente, um dos principais problemas de saúde a nível mundial, sendo uma doença endémica em mais de 100 países e ocorre geralmente em áreas onde as



condições ambientais permitem a multiplicação do parasita no vetor. Atualmente encontra-se restrita às áreas tropicais e subtropicais, embora no passado tenha sido uma doença endêmica em muitos locais do Norte da América, Europa e até em zonas do noroeste Asiático, estando ainda hoje presente na península da Coreia. Contudo, esta distribuição pode ser afetada por alterações climáticas e movimentos populacionais (1). O *Plasmodium falciparum* é a espécie predominante no mundo, *P. vivax* e *P. ovale* ocupam nichos complementares com *P. ovale* a predominar na África Sub-Sahariana e *P. vivax* nas outras áreas, embora as suas localizações geográficas se sobreponham, *P. malariae* apresenta uma distribuição mundial, encontrando-se na América do sul, Ásia e África (2).

A sintomatologia da malária é muitas vezes inespecífica e comum a outras doenças infecciosas. A doença se não for tratada, pode evoluir para formas severas que podem ser fatais muito rapidamente (<24 horas) e deve ser sempre considerada em doentes com historial de exposição (residência ou viagem recente em áreas endêmicas). Os sintomas mais frequentes incluem febre e arrepios de frio, que podem ser acompanhados de dores de cabeça, mialgias, artralgias, fraqueza generalizada, vômitos e diarreia. Os casos mais graves incluem esplenomegalia, anemia, falência renal ou pulmonar e alterações neurológicas. As manifestações clínicas variam substancialmente, dependendo da espécie infectante, da parasitemia e do estado imunitário do paciente (2).

As infeções causadas por *P. falciparum* são as que têm maior probabilidade de progredir para formas severas, potencialmente fatais com envolvimento do sistema nervoso central (malária cerebral), falência renal, anemia grave ou síndrome de stress respiratório do adulto (1).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2018 ocorreram 228 milhões de casos de malária em todo o mundo, essencialmente em África (213 milhões), seguida do sudeste asiático com 3,4% dos casos. Cerca de 405.000 pessoas morreram com a doença, sendo as crianças com idade inferior a 5 anos o grupo que apresenta maior vulnerabilidade. Segundo a OMS, a cada 45 segundos, morre uma criança com malária em África (3).

De acordo com o *Relatório Epidemiológico Anual* de 2018 publicado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), o número de casos notificados na Europa permanece estável, de aproximadamente 1,2 por 100.000 habitantes, foram reportados 8349 casos suspeitos de malária na União Europeia dos quais foram confirmados 8347. A maioria dos casos são importados, à exceção de 14 casos referenciados como adquiridos na UE (10 casos *P. vivax* na Grécia, um caso *Plasmodium* sp. em França, um caso *P. falciparum* e um de infeção mista de *P. malariae* e *P. ovale* em Espanha e um caso *P. falciparum* em Itália) (4).

Em Portugal, os últimos casos de malária autóctone foram diagnosticados em 1959, desde então só têm sido identificados casos importados de países tropicais onde a doença é endêmica. De acordo com o último Relatório das Doenças de Declaração Obrigatória da Direção-Geral da Saúde (DGS) referente ao período 2013-2016, Portugal notificou um total de 669 casos importados: 123 casos em 2013, 128 casos em 2014, 221 casos em 2015 e 197 casos em 2016 (5).

O controlo da malária é um dos objetivos da *WHO Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030*, que tem como objetivos estratégicos até 2025, reduzir a taxa de mortalidade de malária até 75% e prevenir o reaparecimento da doença em todos os países que são considerados “malaria-free” (6).

Atualmente ainda não existe uma vacina eficaz para a prevenção da infeção nos humanos, no sentido de reduzir a intensidade da doença e da sua letalidade, existindo apenas um tratamento farmacológico. Os procedimentos da profilaxia e do tratamento desta doença, consistem na medicação de antifolatos, como a pirimetamina e a sulfadoxina, compostos de quingosu, como a artemisina e derivados de quinolina, como a quinina, a mefloquina, a cloroquina e a primaquina (7).

Estão disponíveis uma variedade de ferramentas efetivas para a prevenção da malária: a utilização em larga escala de redes mosquiteiras impregnadas em inseticidas de ação prolongada; a pulverização intradomiciliária com inseticidas de efeito residual que tem efeito no controlo do vetor tem assumido uma importância significativa na redução das



taxas de morbilidade, ao promover a diminuição do contacto vetor-hospedeiro vertebrado, tal como o uso de larvicidas e a drenagem de águas paradas onde os mosquitos depositam os seus ovos (8). Recomenda-se a utilização da terapia combinada com derivados da artemisinina para a doença aguda, principalmente em crianças. A OMS recomenda tratamento profilático para todas as grávidas em áreas endémicas, embora na prática menos de 20% das mulheres tenham efetivamente adotado esta profilaxia (8).

O diagnóstico laboratorial é absolutamente necessário, visto a sintomatologia da malária ser pouco específica. A metodologia considerada de referência ou “gold standard” continua a ser a observação direta do esfregaço sanguíneo e gota espessa após coloração de Giemsa, pois permite a identificação e diferenciação da espécie e a determinação da parasitemia. Existem outras metodologias para o diagnóstico da malária nomeadamente os testes rápidos (imunodeteção da proteína plasmodial), muito utilizados em saídas de campo nas zonas endémicas, mas que apresentam uma baixa sensibilidade, a deteção de anticorpos, que não diagnostica uma infeção ativa, e, desde a década de 80, as técnicas de biologia molecular, como a PCR, que têm sido desenvolvidas com sucesso (9).

_Objetivo

Efetuar o diagnóstico laboratorial em doentes com quadro clínico compatível com malária cujas amostras biológicas foram recebidas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2010 e dezembro de 2020 e descrever respetivos os dados clínicos, laboratoriais e demográficos.

_Metodologia

Estudaram-se um total de 802 amostras de indivíduos com suspeita clínica de malária, que recorreram ao Laboratório Nacional de Referência (LNR) de Infeções Parasitárias e Fúngicas do INSA para confirmação ou exclusão do diagnóstico, entre 2010 e 2020, tendo sido também analisados os dados demográficos de cada doente elegível para o estudo.

As metodologias de diagnóstico laboratorial utilizadas no presente estudo foram: serológicas – determinação de anticorpos IgG para *Plasmodium falciparum* – IFI (Euroimmun); moleculares – PCR em tempo real com a amplificação específica de uma região conservada que permite a amplificação e deteção de 4 espécies de *Plasmodium* sp. através de um conjunto de primers e sondas para o gene 18S (*FTD Malaria differentiation Kit*) e PCR em tempo real que permite a amplificação e deteção de 4 espécies de *Plasmodium* sp. através de um conjunto de primers e sondas para o gene 18S, adaptada de Swan *et al.*), e a pesquisa direta em gota espessa e esfregaço.

_Resultados

Entre janeiro de 2010 e dezembro de 2020, foram analisados 802 produtos biológicos para pesquisa de *Plasmodium* sp., 15 dos quais provenientes do surto de ébola que ocorreu na África Ocidental em 2014/2015. Detetaram-se um total de 124 (15,5%; 124/802) casos positivos: 79 (63,7%) diagnosticados por métodos serológicos; 40 (32,2%) por técnica de PCR e 5 (4,1%) por pesquisa direta em gota espessa e esfregaço após coloração de Giemsa. A distribuição dos casos ao longo dos anos mostra um aumento de casos analisados até 2015, notando-se a partir daí uma diminuição do número de amostras testadas no LNR Infeções Parasitárias e Fúngicas (tabela 1).

No que se refere aos 79 casos com serologia positiva, 43 foram parturientes nascidas ou que tenham viajado nos últimos 3 anos para regiões endémicas de malária. A média de idade destas mulheres é de 30 anos. Os restantes 36 casos com serologia positiva (24 do sexo masculino e 12 do sexo feminino) foram viajantes, residentes maioritariamente na zona centro de Portugal, com uma média de idade de 44 anos.

Quanto aos 40 casos positivos por PCR, 6 casos (5 *Plasmodium falciparum* e 1 *Plasmodium vivax*) suspeitos de infeção pelo vírus Ébola (surto 2014), cujo diagnóstico diferencial incluiu a pesquisa de *Plasmodium* sp. Todos em indivíduos eram adultos do sexo masculino provenientes da Nigéria, Guiné Conacri e Guiné Bissau com diagnóstico compatível

**Tabela 1:** ↓ Distribuição do número de casos positivos e negativos entre 2010 e 2020.

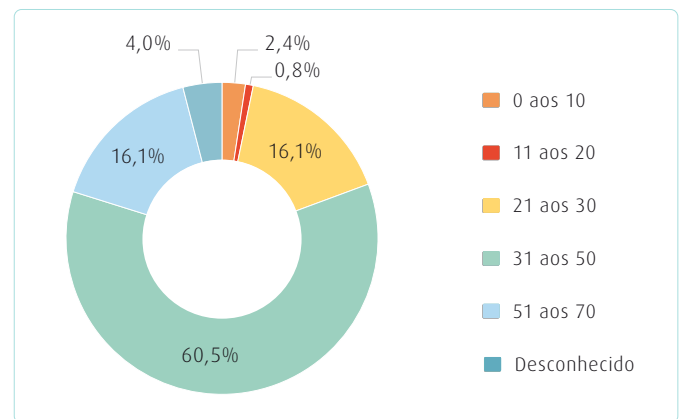
Ano	Casos positivos		Casos negativos		Total	
	n	%	n	%	n	%
2010	3	2.4	4	0.6	7	0.9
2011	2	1.6	14	2.1	16	2.0
2012	0	0	9	1.3	9	1.1
2013	11	8.9	131	19.3	142	17.7
2014	39	31.5	258	39.6	297	37.0
2015	23	18.5	125	18.4	148	18.5
2016	13	10.5	26	3.8	39	4.9
2017	12	9.7	30	4.4	42	5.2
2018	15	12.1	26	3.8	41	5.1
2019	3	2.4	28	4.1	31	3.9
2020	3	2.4	27	4.0	30	3.7
Total	124	100	678	100	802	100

com malária (febre, mialgias cefaleias, diarreias); Os 4 casos importados provenientes da Madeira, eram doentes do sexo masculino emigrantes em Moçambique, Angola e Guiné Equatorial com quadro clínico suspeito de paludismo, tendo sido detetado em dois casos DNA referente à espécie *P. ovale*; uma coinfeção de *P. falciparum* com *P. malariae* e um caso de *P. falciparum*. Os restantes casos são indivíduos residentes no norte e centro de Portugal e as espécies identificadas foram *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. vivax*, em doentes que também referem ter efetuado viagens recentes para zonas endémicas de malária e em duas crianças de 6 e 10 anos, a primeira das quais positiva para *P. vivax* e na segunda não foi possível identificar a espécie. Em ambas, desconhece-se o historial clínico e de viagens.

Distribuição de casos positivos por sexo e grupo etário

Dos 124 doentes com infeção confirmada, 61 (49,2%) eram do sexo masculino e 63 casos (50,8%) do género feminino. Nos 10 anos em avaliação observou-se que 75,8% (94/124) dos casos ocorreram em adultos com idade igual ou superior a 31 anos, sendo o grupo etário entre 31 e 50 anos o que revelou um maior número de infeções por *Plasmodium* sp.

(60,5% (75/124). No **gráfico 1** apresenta-se a distribuição dos casos positivos de infeções por *Plasmodium* sp por grupo etário.

Gráfico 1: ↓ Distribuição por grupo etário dos casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. analisados no INSA entre 2010-2020.

De acordo com os resultados obtidos ao longo dos 10 anos em estudo e no que respeita à sazonalidade, verificou-se sempre um aumento do número de casos positivos nos meses de novembro (24%) e dezembro (16%), em comparação com os restantes meses dos 10 anos estudados (**gráfico 2**).

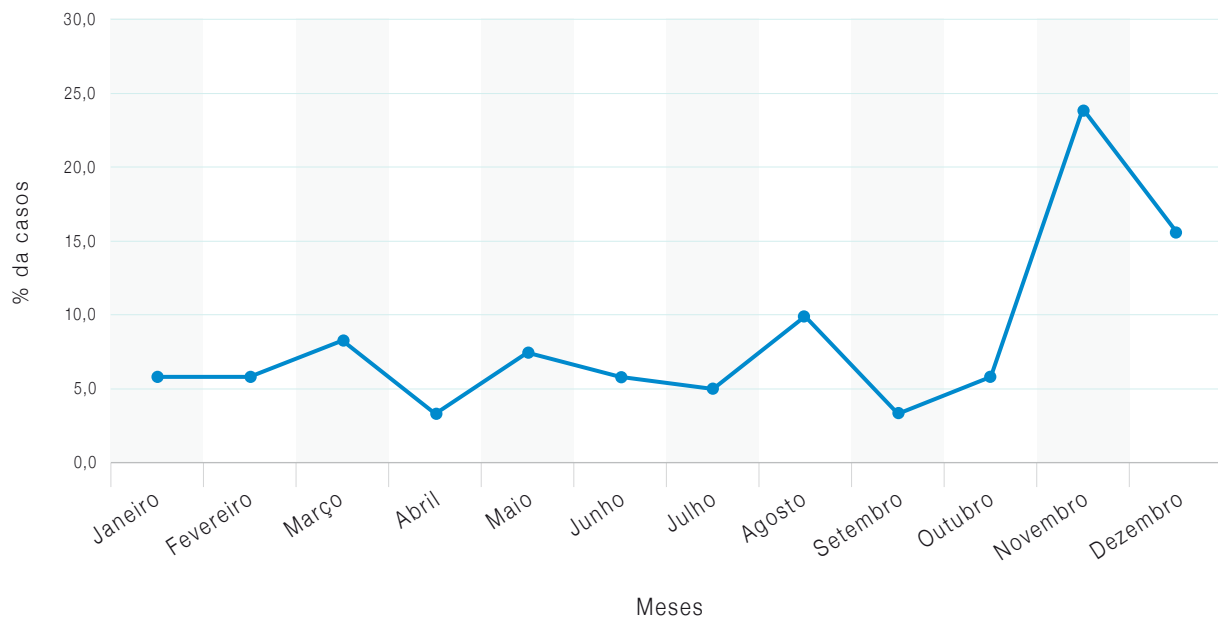
_Discussão e conclusões

No período dos 10 anos em estudo, verificou-se um acréscimo do número de amostras recebidas para pesquisa de malária no INSA durante os anos de 2014 e 2015, o que está provavelmente relacionado com o aumento do número de viagens neste período, tendo vindo a decrescer nos anos subsequentes, possivelmente devido a um retrocesso na emigração para países onde a malária é endémica. Todos os casos de malária são importados e implicam viagens para países endémicos para esta doença.

A maioria dos notificados pelos países da União Europeia (UE) em 2018 foram importados. Os países que reportam os números mais elevados de casos têm ligações históricas, económicas, linguísticas e culturais com áreas endémicas, particularmente em África e América. A sazonalidade e a



Gráfico 2: ↓ Distribuição dos casos positivos para *Plasmodium* sp. por mês de diagnóstico laboratorial, 2010-2020.



distribuição etária dos casos na Europa refletem os padrões dos países onde a doença é endémica. A literatura sugere que uma proporção substancial dos casos importados de malária na UE ocorre entre imigrantes recentes e imigrantes já estabelecidos e as suas famílias que viajaram para visitar amigos e familiares em zonas endémicas (4).

Na Europa, em 2018, a maioria dos casos confirmados foram do sexo masculino. O grupo etário com maior taxa de incidência foi dos 25-44 anos, seguido dos 45-64 anos nos homens e dos 15-24 anos nas mulheres (4). De acordo com os resultados obtidos no INSA e no período em estudo observou-se que os mesmos são consistentes com os dados europeus no que respeita à distribuição por grupo etário, tendo ocorrido uma maior incidência de casos em adultos entre os 31 e 50 anos de idade. No que se refere à distribuição por sexo, os nossos resultados revelaram uma distribuição equitativa, uma vez que o sexo masculino reflete o padrão de viajantes portugueses que desenvolvem a sua atividade profissional entre a Europa e África, e também porque Portugal recebe parturientes, de nacionalidade portuguesa ou estrangeira, residentes nos países de língua oficial portuguesa.

Verifica-se uma sazonalidade marcante entre os 26 países que reportaram casos de malária de 2014 a 2018, com um aumento de casos durante e imediatamente após os meses das férias de verão (julho-setembro) (4). Em Portugal, o mesmo não se observou, apesar de não se conhecer os motivos concretos das viagens (férias, trabalho, épocas festivas ou visita a amigos/familiares, entre outros) dos casos em estudo. Contudo, a distribuição de casos positivos obtidos neste estudo teve um aumento nos meses de novembro e dezembro, facto que parece refletir deslocações relacionadas com a época natalícia dada a forte ligação histórica do nosso país com os países africanos, ex-colónias portuguesas.

A malária é uma doença evitável através da utilização de terapêuticas profiláticas. A escolha da terapêutica e das medidas preventivas dependem maioritariamente do perfil epidemiológico local da malária, da duração da exposição aos vetores, dos padrões de resistência aos antiparasitários, da sazonalidade, do grau de transmissibilidade, da idade e da gestação (3).



Face às alterações climáticas que estão a ocorrer à escala planetária e à presença do vetor na Europa, estudos com modelos preditivos sobre a hipótese de reintrodução da malária neste continente têm mostrado a possibilidade de esta parasitose poder vir a tornar-se endémica no final deste século (9). Quanto a Portugal, um estudo com base num modelo potencial de risco de transmissão da malária, concluiu que a possibilidade de reemergência de malária, em Portugal continental é relativamente baixa, não se pode descurar essa possibilidade sob a forma de focos autóctones esporádicos, sendo esta uma realidade recentemente verificada em alguns países do sul da Europa, onde foram reportados como adquiridos localmente sete casos, cinco dos quais confirmados na Grécia como *Plasmodium vivax* em áreas rurais. Esta constatação torna indispensável que se efetue um correto e atempado diagnóstico laboratorial, que se mantenha uma vigilância ativa na prevenção e monitorização de eventuais surtos epidémicos de malária em Portugal (10).

Uma vez que é possível na Europa a transmissão local e que há um grande número de viajantes entre o continente europeu e os países onde esta parasitose é endémica, importa, pois, manter vigilância epidemiológica e medidas preventivas sobre a afluência de indivíduos infetados com paludismo, quer se trate de portugueses, quer de imigrantes que habitam ou transitam por Portugal, sem esquecer, obviamente, o número crescente de turistas, nacionais e estrangeiros. O INSA participa na vigilância epidemiológica da malária através da Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE) nos portos e aeroportos, tanto no controlo do vetor como na posterior identificação da presença do parasita nos insetos. Assim sendo, e relacionando o aumento das referidas viagens com as alterações climáticas, nomeadamente o aquecimento global, fatores que contribuem para disseminação da malária para a Europa, torna-se absolutamente necessária a vigilância epidemiológica do parasita de modo a controlar/impedir este acontecimento.

Agradecimento:

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) White NJ. Malaria. IN: Alimuddin I, Zumla AI (eds.) *Manson's Tropical Diseases*. 22nd ed. Philadelphia: Saunders, 2009, pp. 1201-1300. 2. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
- (2) Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern - Malaria [Internet] (consult. 10/5/2021). Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
- (3) World Health Organization. *World malaria report 2019*. Geneva: WHO, 2019. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330011>
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. *Malaria - Annual epidemiological report 2018*. Stockholm: ECDC, 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2018>
- (5) Direção-Geral da Saúde. *Doenças de Declaração Obrigatória, 2011-2014 - Volume I Portugal*. Lisboa: DGS, 2014. <https://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/doencas-de-declaracao-obrigatoria-2011-2014-volume-i-pdf.aspx>
- (6) RBM Partnership to End Malaria Vision [Internet]. [consult. 10/5/2021]. Disponível em: <https://endmalaria.org/about-us/vision>
- (7) Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, et al. Malaria in Maremma, Italy. *Lancet*. 1998 Apr 25;351(9111):1246-7. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)10312-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)10312-9)
- (8) Rolling back malaria. IN: World Health Organization. *The World Health Report 1999*. Geneva: WHO, 1999. Pp. 49-63. https://www.who.int/whr/1999/en/whr99_ch4_en.pdf?ua=1
- (9) Gargate MJ. Doenças associadas a mosquitos: malária. IN: Núncio MS, Alves MJ (eds). *Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores*. 2ª ed (rev. e atualiz.). Lisboa: INSA, 2019, pp.63-8. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2232>
- (10) David de Morais J. Malária em Portugal: passado, presente e perspectivas futuras - II parte. *RPDI*.2014 set-dez;10(3):113-121. http://spdimc.org/wp/wp-content/uploads/2014/11/RPDI_10-3_Internet.pdf
- (11) Gomes, EJC. Risco potencial de transmissão de malária em Portugal Continental. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Sociais e humanas, Universidade Nova de Lisboa, 2010. <https://run.unl.pt/handle/10362/4156>