

Malária: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção por *Plasmodium sp.* entre 2010-2017

Malaria: laboratory confirmation of clinical suspected cases of Plasmodium sp. between 2010-2017

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 5 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 frequente 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 descrever as características demográficas dos casos de malária, em doentes com quadro clínico compatível e cujo diagnóstico laboratorial foi confirmado. 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 700 amostras, 15 das quais provenientes do surto de ébola (África Ocidental, 2014/2015). Detetaram-se 103 (14,7%) casos positivos. Todos os casos positivos de malária são importados. A maioria dos casos ocorreu em viajantes, indivíduos adultos. Pelo facto da 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 describe the demographic characteristics of malaria cases, in patients with clinical symptoms compatible with malaria and whose laboratory diagnosis was confirmed. 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 analyzed 700 specimens, 15 of which belonging to Ebola outbreak (West Africa, 2014/2015). One hundred and three (14.7%) were positive cases. All positive cases of malaria are imported. Most cases occurred in adults travellers. Since local transmission contin-

ues 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 ou paludismo é uma infeção parasitária, não contagiosa, de evolução crónica, com manifestações episódicas de carácter agudo, 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 num indivíduo. Em situações excecionais, a doença pode ser transmitida por transfusão sanguínea ou via congénita, contudo estas duas formas de transmissão não têm qualquer expressão epidemiológica ⁽¹⁾. Existem aproximadamente 156 espécies de *Plasmodium* que infetam várias espécies de vertebrados, mas apenas cinco infetam o Homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, uma espécie que causa malária em macacos do sudeste asiático e que se encontra circunscrita à Malásia ⁽¹⁾. O *P. falciparum* e *P. vivax* são as espécies mais prevalentes nos humanos sendo o *P. falciparum* a que apresenta uma patogenia mais agressiva, com mais complicações clínicas e elevada letalidade ⁽²⁾.

O ciclo de vida do parasita da malária envolve dois hospedeiros: o homem e o mosquito e divide-se em três fases: a fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado (mosquito), designado ciclo esporogónico e duas fases assexuadas que ocorrem no Homem, o ciclo exoeritrocítico (fígado) e o ciclo eritrocítico (glóbulos vermelhos) ⁽³⁾.

Os primeiros sintomas surgem geralmente 8-25 dias após a infeção, com um quadro clínico semelhante ao de um síndro-

ma gripal, podendo ocorrer tremores seguidos da rápida subida da temperatura corporal acompanhados por náuseas, vômitos, cefaleias, dores musculares e abdominais, anemia, falta de apetite e distúrbios gastrointestinais. Durante o período de febre alta pode surgir um quadro de esplenomegalia. Quando a temperatura começa a baixar o doente apresenta intensa sudorese que se pode prolongar por vários minutos ou horas – sintomas característicos de malária não grave. A malária grave ocorre quando há falência dos órgãos vitais e alterações metabólicas, bioquímicas e clínicas com elevada parasitemia, tais como: anemia grave, hemoglobinúria, alteração na coagulação, acidose metabólica, hipoglicémia, dificuldade respiratória, perda de consciência, convulsão, coma ou outras alterações neurológicas (1).

A malária é considerada a doença parasitária com maior impacto mundial, sendo a grande causadora de doença em países tropicais e subtropicais, afetando principalmente crianças com menos de cinco anos e grávidas. As espécies de *Plasmodium* distribuem-se de modo diferente entre as regiões onde a doença é endémica. *P. falciparum* predomina em África, Nova Guiné e Haiti, enquanto o *P. vivax* é mais frequente na América Central. A prevalência destas duas espécies é semelhante à encontrada na América do Sul, no Subcontinente Indiano, na Ásia oriental e na Oceânia. Apesar de *P. malariae* coexistir na maioria das áreas endémicas, especialmente na África subsariana, a sua prevalência é muito menos comum. Em relação ao *P. ovale* é pouco frequente fora do Continente africano, estimando-se prevalências globais inferiores a 1% (4).

Desde os tempos mais antigos que a malária é identificada como episódios febris caracterizados por recorrências de febre “terça benigna” (*P. vivax*) e febre “quartã” (*P. malariae*), por não estarem associados a formas severas e fatais da doença. A febre “terça maligna” ou “subterça maligna” era atribuída ao *P. falciparum*, associado a formas severas e fatais (1).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2016 tenham sido identificados 216 milhões de casos de malária a nível mundial com cerca de 445.000 mortes, principalmente crianças <5 anos de idade na África subsariana (4).

Na Europa, e de acordo com o Relatório Epidemiológico Anual de 2015 publicado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), a incidência da malária permanece estável, com aproximadamente 1 caso por 100 000 habitantes. Dos 7271 casos notificados em 2015 pelos 26 estados-membros da União Europeia 6199 tiveram confirmação laboratorial. A maioria dos casos foram importados, à exceção de sete casos referenciados como autóctones em países da União Europeia (cinco casos declarados pela Grécia, que tem vindo a notificar casos autóctones de infeção por *P. vivax* desde 2009, e um caso pela Bélgica e outro pela Holanda) (5).

Em Portugal, os últimos casos de malária autóctone foram diagnosticados em 1959, desde então só têm sido identificados casos importados provenientes de países tropicais onde a doença é endémica. De acordo com o último Relatório das Doenças de Declaração Obrigatória da Direção Geral da Saúde (DGS) referente ao período 2011-2014, Portugal notificou 373 casos importados: 64 casos em 2011, 58 casos em 2012, 123 casos em 2013 e 128 casos em 2014 (6).

A malária é uma doença evitável através da utilização de drogas profiláticas. O controlo da malária é uma das metas da “*WHO Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030*” que tem como objetivos estratégicos até 2030: reduzir os casos de incidência de malária até 90%; reduzir as taxas de mortalidade de malária até 90%; eliminar a doença em pelo menos 35 países e prevenir o reaparecimento da parasitose em todos os países que são considerados “livres de malária” (4).

A utilização de terapia combinada com derivados da artemisinina tem sido recomendada para a doença aguda, principalmente em crianças, bem como no tratamento intermitente preventivo em mulheres grávidas. A utilização de redes mosquiteiras impregnadas em inseticidas de ação prolongada, a pulverização intra domiciliária com inseticidas de efeito residual, que tem efeito no controlo do vetor, têm assumido uma importância significativa na diminuição da morbidade, ao reduzir o contacto vetor-hospedeiro vertebrado. A drenagem de águas paradas onde os mosquitos depositam os seus ovos constitui também um dos fatores que tem contribuído positivamente para o controlo da malária (7).

_Objetivo

Com este trabalho pretendeu-se efetuar uma análise descritiva das características demográficas dos casos com quadro clínico e epidemiológico suspeito de infeção por *Plasmodium* sp., que foram confirmados no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2010 e dezembro de 2017.

_Métodos

Foi efetuado o diagnóstico laboratorial a todos os doentes com quadro clínico compatível com infeção por *Plasmodium* sp., cujos produtos biológicos foram enviados ao Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do INSA para confirmação ou exclusão do diagnóstico entre 2010 e 2017.

As metodologias de diagnóstico laboratorial utilizadas foram: serológicas (determinação de anticorpos IgG para *Plasmodium falciparum* – IFI (Euroimmun)); moleculares (PCR em tempo real que permite a deteção e amplificação 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. Para a análise descritiva dos dados demográficos dos casos suspeitos e confirmados, recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas.

_Resultados

O diagnóstico laboratorial da infeção por *Plasmodium* sp. foi realizado em amostras clínicas de 700 doentes suspeitos de malária entre 2010 e 2017, dos quais 15 indivíduos integravam o surto de ébola que ocorreu na África Ocidental em 2014/2015.

Durante o período sob observação foram confirmados 103 (14,7%; 103/700) casos de infeção por *Plasmodium* sp.; 68 (66,0%) diagnosticados por métodos serológicos; 31 (30,1%) por PCR e 4 (3,9%) por pesquisa direta em gota espessa e esfregaço após coloração de Giemsa. A **tabela 1** mostra a distribuição temporal do número total de casos clínicos suspeitos de malária analisados no INSA entre 2010 e 2017 e o número de casos com diagnóstico laboratorial positivo.

Tabela 1: Distribuição do número de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. analisados no INSA entre 2010 e 2017, por ano de diagnóstico.

Ano	Casos positivos		Casos negativos		Total	
	n	%	n	%	n	%
2010	3	2,9	4	0,7	7	1,0
2011	2	1,9	14	2,3	16	2,3
2012	0	0	9	1,5	9	1,3
2013	11	10,6	131	21,9	142	20,2
2014	39	37,8	258	43,2	297	42,4
2015	23	22,3	125	20,9	148	21,1
2016	13	12,6	26	4,3	39	5,6
2017	12	11,6	30	5,0	42	6,0
Total	103	100	597	100	700	100

Distribuição de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. entre 2010 e 2017, por género e grupo etário

Dos 103 doentes com infeção por *Plasmodium* sp. confirmada, 50 (48,5%) pertenciam ao género masculino e 53 casos (51,5%) ao género feminino. Durante os 8 anos em estudo observou-se que 80,6% (83/103) 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. - 65,0% (67/103). No **gráfico 1** apresenta-se a distribuição etária dos casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp.

Distribuição de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. entre 2010 e 2017, por mês

De acordo com os resultados obtidos no que respeita à sazonalidade, foi nos meses de novembro (20,4%) e dezembro (12,6%) que se verificou um maior aumento do número de casos de infeção por *Plasmodium* sp., em relação ao restante período do ano, como se pode verificar no **gráfico 2**.

Gráfico 1: Distribuição do número de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. analisados no INSA entre 2010-2017, por grupo etário.

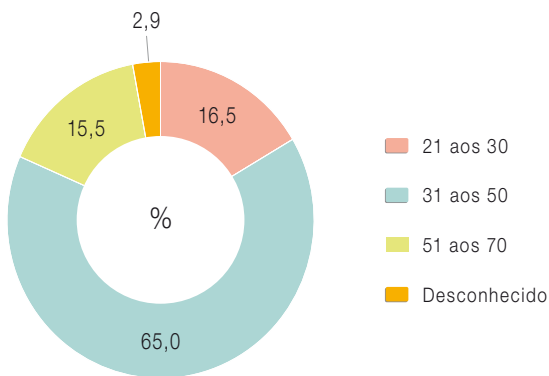
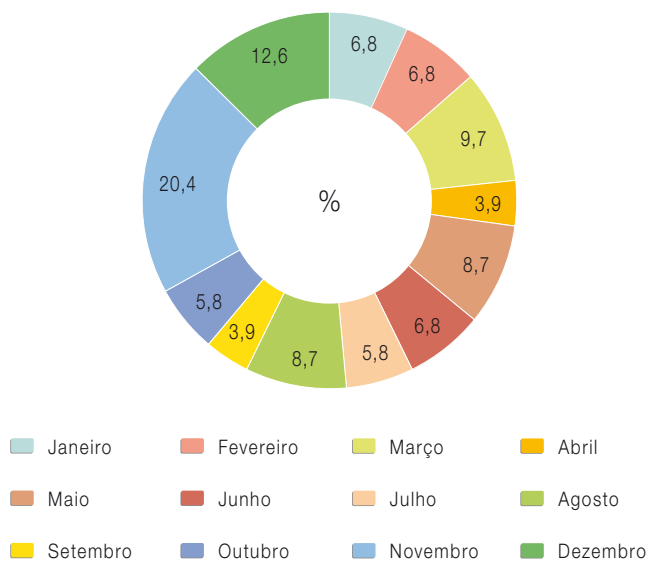


Gráfico 2: Distribuição do número de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. entre 2010-2017, por mês.



Distribuição de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. entre 2010 e 2017, por método de diagnóstico e espécie identificada

Dos 103 doentes com infeção por *Plasmodium* sp. confirmada, 68 (66,0%) foram diagnosticados por métodos serológicos; 31 (30,1%) por PCR e 4 (3,9%) por pesquisa direta em gota espes-

sa e esfregaço após coloração de Giemsa. Relativamente aos 68 casos com serologia positiva, 41 foram amostras enviadas de parturientes nascidas ou que tenham viajado nos últimos 3 anos para regiões endémicas de malária e que efetuaram o rastreio para colheita de células do cordão umbilical; a média de idade destas mulheres é de 30 anos. Os restantes 27 casos (22 do sexo masculino e 5 do sexo feminino) são viajantes, residentes maioritariamente na zona centro de Portugal (distrito de Coimbra), com uma média de idade de 46 anos. Com respeito aos 31 casos positivos por PCR incluem 6 casos (cinco *Plasmodium falciparum* e um *Plasmodium vivax*) suspeitos de infeção pelo vírus Ébola (surto 2014/2015), cujo diagnóstico diferencial incluía a pesquisa de *Plasmodium* sp., todos em indivíduos adultos do sexo masculino provenientes da Nigéria, Guiné Conacri e Guiné Bissau com diagnóstico compatível com malária (febre, mialgias cefaleias, diarreias); 4 casos provenientes da Madeira, todos importados, de 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 do país e as espécies identificadas foram *P. falciparum* e *P. ovale* em doentes que também referem ter efetuado viagens recentes para zonas endémicas de malária.

_Discussão e conclusões

A sintomatologia inespecífica da malária, que se apresenta como uma síndrome febril, não é clinicamente distinguível de um vasto leque de outras doenças, pelo que é absolutamente necessário a realização do diagnóstico laboratorial.

Ao longo dos oito anos em análise verificou-se que entre 2013 e 2015 houve um aumento do número de diagnósticos laboratoriais de casos suspeitos de infeção por *Plasmodium* sp. solicitados ao INSA. Este facto, pode dever-se a um aumento do número de viagens para regiões endémicas nestes anos, como também ao alerta mediático resultante do surto de Ébola ocorrido na Guiné Conacri Serra Leoa em 2014/2015.

Todos os casos de malária foram importados e estavam relacionados com viagens a países onde a doença é endêmica.

Na Europa a maioria dos casos registados referem-se a indivíduos do sexo masculino nos grupos etários dos 15-24 anos e dos 25-44 anos (5). De acordo com os resultados obtidos no INSA, observou-se que os mesmos são consistentes com os dados europeus no que respeita à distribuição por grupo etário, tendo ocorrido uma maior frequência de casos em adultos entre os 31 e 50 anos de idade durante o período em análise.

No que se refere à distribuição por sexo, os nossos resultados revelaram uma distribuição equitativa pois, se por um lado, o sexo masculino reflete o padrão de viajantes portugueses que desenvolvem a sua atividade profissional entre a Europa e África, por outro, Portugal recebe com muita frequência parturientes, de nacionalidade portuguesa ou estrangeira, residentes nos países de língua oficial portuguesa.

A sazonalidade observada não reflete os padrões europeus de viagens para países onde a malária é endêmica (países tropicais e subtropicais), sendo que não obtivemos informação sobre os motivos das viagens (férias, trabalho ou visita a amigos/familiares) dos casos em estudo. Os outros países europeus registaram um aumento claro de casos diagnosticados durante os meses das férias de verão (julho, agosto e setembro), enquanto que a distribuição de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp diagnosticados no INSA foi mais elevada nos meses de novembro e dezembro. A forte ligação histórica do nosso país aos países africanos de língua oficial portuguesa, pode explicar esta distribuição da sazonalidade, que possivelmente está relacionada com a vinda a Portugal dos trabalhadores emigrantes portugueses no período natalício.

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 endêmica no final deste século (8). Quanto em Portugal, um estudo com base num modelo potencial de

risco de transmissão da malária, concluiu que a possibilidade de reemergência de malária endêmica em Portugal Continental é atualmente relativamente baixa, embora não se possa descurar a possibilidade da sua reemergência sob a forma de focos autóctones esporádicos. Esta realidade foi recentemente verificada em alguns países do Sul da Europa, onde foram notificados como adquiridos localmente sete casos autóctones, cinco dos quais na Grécia confirmados como *Plasmodium vivax*, em áreas rurais onde a presença do vetor em combinação com indivíduos que viajam de países endémicos é uma realidade (9).

Visto continuar a ser possível na Europa a transmissão local e o elevado número de viajantes entre o continente europeu e os países onde esta parasitose é endêmica, importa, pois, manter a 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 nos portos e aeroportos (REVIVE), tanto no controlo do vetor como na posterior identificação da presença do parasita nos insetos. Assim sendo, e correlacionando 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 (10).

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) WHO Global Malaria Programme. Malaria - Information for travellers [Em linha]. (consult. 13/7/2018). <http://www.who.int/malaria/travellers/en/>
- (3) Gargaté, MJ. Doenças associadas a mosquitos: malária. IN: Nuncio MS, Alves MJ (eds). Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores. Lisboa: INSA, 2014, pp.53-8. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2232>
- (4) World Health Organization. World Malaria Report 2014. Geneva: WHO, 2014. www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/
- (5) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2015: emerging and vector-borne diseases. Stockholm: ECDC, 2015. http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/emerging-vector-borne-diseases_annual-epidemiological-report-2015.pdf
- (6) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória, 2011-2014 - Volume I. Lisboa: DGS, 2014. <https://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/doencas-de-declaracao-obrigatoria-2011-2014-volume-i-pdf.aspx>
- (7) Roll Back Malaria Partnership. Economic costs of malaria. Geneva: World Health Organization, [2003]. <https://www.malariaconsortium.org/userfiles/file/Malaria%20resources/RBM%20Economic%20costs%20of%20malaria.pdf>
- (8) David de Moraes J. Malária em Portugal: passado, presente e perspectivas futuras - II parte. RPDl. 2014;10(3):113-21. http://spdimc.org/wp/wp-content/uploads/2014/11/RPDI_10-3_Internet.pdf
- (9) Gomes EJC. Risco potencial de transmissão de malária em Portugal Continental. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Sociais e humanas da Universidade Nova de Lisboa, 2010. <https://run.unl.pt/handle/10362/4156>
- (10) Reis T, Ferreira I, Martisn S, et al. Malária: estudo retrospectivo de casos clínicos suspeitos de infeção por Plasmodium sp. entre 2010 e 2014. Boletim Epidemiológico Observações. 2016;5(15):19-22. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3697>