



Universidade de Brasília



**Universidade de Brasília
Núcleo de Medicina Tropical
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

Daniel Roberto Coradi de Freitas

**Avaliação do risco de transmissão de malária por
transfusão de sangue na área endêmica brasileira**

**Brasília
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1015406.

F866a Freitas, Daniel Roberto Coradi de.
Avaliação do risco de transmissão de malária por transfusão de sangue na área endêmica brasileira / Daniel Roberto Coradi de Freitas. -- 2014.
156 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.

Inclui bibliografia.

Orientação: Elisabeth Carmen Duarte.

1. Malária - Prevenção. 2. Sangue - Transfusão.
3. Avaliação de riscos de saúde. 4. Reação em cadeia de polimerase. I. Duarte, Elisabeth Carmen. II. Título.

CDU 616.936(81)

Daniel Roberto Coradi de Freitas

**Avaliação do risco de transmissão de malária por transfusão
de sangue na área endêmica brasileira**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical (área de concentração Epidemiologia) pelo Programa de Pós Pós-Graduação em Medicina Tropical do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília.

Orientadora: Professora Doutora Elisabeth Carmen Duarte

Co-orientador: Professor Doutor Cor Jesus Fernandes Fontes

**Brasília
2014**

DATA DA DEFESA E APROVAÇÃO DA TESE

04 de abril de 2014

BANCA EXAMINADORA

Professora Doutora Elisabeth Carmen Duarte (presidente)
Universidade de Brasília

Professor Doutor Gustavo Adolfo Sierra Romero (membro)
Universidade de Brasília

Professor Doutor Mauro Niskier Sanchez (membro)
Universidade de Brasília

Professor Doutor Wildo Navegantes Araújo (membro)
Universidade de Brasília

Doutor Marcelo Augusto Nunes Medeiros (membro)
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

Professora Doutora Maria Regina Fernandes de Oliveira (suplente)
Universidade de Brasília

DEDICATÓRIA

Aos trabalhadores e trabalhadoras que com o suor do seu trabalho permitiram que eu concluísse toda a minha jornada acadêmica, do pré-primário ao doutorado, em instituições de ensino públicas e gratuitas.

Aos três recém-nascidos que faleceram após terem sua situação de saúde agravada pela malária transmitida por transfusão de sangue e que motivaram esta tese.

Aos filhos amados, Samuel e Gustavo, nascidos durante a realização desta tese e que, com gargalhadas e abraços, cuidaram de mim nesta jornada.

À Chris, companheira amada, eternamente amada, inspiração para eu tentar ser melhor na minha existência.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Elisabeth Carmen Duarte, pelos momentos infinitamente agradáveis e valorosos tanto nas reuniões de orientação e discussão desta tese como no bom bate-papo sobre a vida.

Ao professor Cor Jesus Fernandes Fontes pelas valiosas contribuições, por acreditar neste projeto e ceder o espaço do seu laboratório para a realização de toda a parte laboratorial.

Aos professores Pedro Luiz Tauil e Leila Posenato pelo apoio na elaboração do projeto inicial que foi essencial para a obtenção do financiamento.

Ao biólogo Luciano Teixeira Gomes e ao médico Lorrin W. Pang pelas valiosas contribuições no estudo de validação da *Nested PCR*.

Aos diretores e responsáveis técnicos dos serviços de hemoterapia selecionados para esta pesquisa por abrirem as portas das instituições tanto na permissão de uso do espaço físico para a coleta dos dados e das amostras dos sujeitos da pesquisa como por mostrarem honestamente suas fortalezas e fragilidades.

Aos pesquisadores de campo que cuidadosamente abordaram cada sujeito da pesquisa e se dedicaram na coleta verdadeira dos dados epidemiológicos.

Aos sujeitos da pesquisa por cederem seu tempo e seu sangue.

Ao Diretor da Anvisa, Dirceu Barbano, por acreditar e defender o apoio financeiro para a realização desta pesquisa, aos meus chefes imediatos na Anvisa durante a realização desta tese, Amauri Leite, Geni Câmara e Luiz Armando e para as queridas “meninas da GETOR”, Glaucia, Lara, Marília, Marina, Renata e Valéria pelo incondicional apoio.

Aos meus pais, Seu Décio e Dona Marilda e aos meus irmãos Denis, Denimar, Darlei, Dimara e Darlene e queridos sobrinhos(as) e cunhados(as) por me fazer sentir próximo, mesmo tão distante.

Ao CNPq, Ministério da Saúde e Anvisa pelo apoio financeiro.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

RESULTADOS

Artigo 1

Tabela 1: Resultado da sensibilidade da *nested PCR* nos *pools* de amostras de sangue total usando três diluições (n=63) oriundas de 21 amostras positivas para *Plasmodium* spp..... 67

Artigo 2

Quadro 1. Distribuição percentual por estrato (serviço de hemoterapia) e número total de indivíduos segundo o cálculo da amostra estratificada proporcional..... 82

Tabela 1. Características dos candidatos à doação de sangue de quatro serviços de hemoterapia (A, B, C e D) da Região Amazônica, Brasil, 2009 a 2010..... 89

Tabela 2. Prevalência [P (%)] e intervalos de 95% de confiança (IC95%) de fatores de risco para infecção por *Plasmodium* em candidatos à doação de sangue de quatro serviços de hemoterapia da região amazônica, Brasil, 2009 a 2010..... 91

Tabela 3: Valores dos parâmetros de acurácia da validade da triagem clínica, epidemiológica e laboratorial de quatro serviços de hemoterapia da Região Amazônica Brasileira, tendo como padrão-ouro a *nested PCR*, Brasil 2009 a 2010..... 93

Artigo 3

Quadro 1 – Descrição do modelo de classificação do serviço de hemoterapia e de seus setores/atividades segundo a pontuação obtida após a avaliação..... 111

Quadro 2 – Detalhamento dos critérios verificados para cada setor e atividade dos serviços de hemoterapia, sua pontuação e o item da RDC 153 que se utilizou para fundamentar a exigência..... 112

Tabela 1: Pontuação final obtida em cada setor/atividade e a classificação dos dez serviços de hemoterapia de acordo com os critérios estabelecidos nesta avaliação..... 118

Tabela 2: Pontuação obtida em cada item avaliado nos dez serviços de hemoterapia pesquisados (A até J) da Região Amazônica Brasileira..... 119

APÊNDICE

Apêndice 1. Quadro com o resumo da regulação sanitária para prevenção da transmissão da malária por transfusão de sangue e componentes, Brasil, 1950 a 2013..... 139

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Componentes básicos do ciclo produtivo do sangue no Brasil.....	35
---	----

RESULTADOS

Artigo 2

Figura 1: Distribuição percentual dos motivos de inaptidão de candidatos à doação de sangue, por sexo, na primeira (a) ou segunda (b) etapa da triagem clínica e epidemiológica em três serviços de hemoterapia (A, C e D) (n=402 candidatos à doação), Brasil, 2009 e 2010.....	90
--	----

Artigo 3

Figura 1: Modelo ideal com a descrição das melhores práticas para a máxima redução do risco de malária transmitida por transfusão (MTT) segundo a RDC Anvisa nº 153/2004.....	114
---	-----

LISTA DE ABREVIações

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DNA – ácido desoxirribonucleico

FRMal – fatores de risco para malária

IC95% - intervalo de confiança a 95%

IPA – Índice Parasitário Anual

MS – Ministério da Saúde

MTT – malária transmitida por transfusão

NAT – testes para detecção de ácidos nucleicos

Nested PCR – reação em cadeia da polimerase aninhada

Notivisa - Sistema de Notificações em Vigilância Sanitária

PAP – portador assintomático de infecção por *Plasmodium*

PCR – reação em cadeia da polimerase

PIACM - Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária

PNCM – Programa Nacional de Controle da Malária

OMS – Organização Mundial da Saúde

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

rRNA – ácido ribonucleico ribossomal

SIVEP-Malária – Sistema de Vigilância Epidemiológica da Malária da Região Amazônica

SH – serviço(s) de hemoterapia

SNH – Sistema Nacional de Hemovigilância

VE – vigilância epidemiológica

FINANCIAMENTO

Instituições financiadoras

a) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Saúde. Edital Doenças Negligenciadas II, processo nº 576235/2008-3 sob a coordenação do Professor Doutor Cor Jesus Fernandes Fontes no valor de R\$ 152.876,00.

b) Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Financiamento complementar concedido por meio de diárias e passagens para um pesquisador para até 10 deslocamentos para os municípios onde estavam localizados os serviços de hemoterapia da Região Amazônica que foram pesquisados.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Situação epidemiológica da malária no mundo e no Brasil.....	18
2.2. Malária transmitida por transfusão de sangue.....	27
2.2.1. Mecanismos biológicos da transmissão natural da malária e por transfusão de sangue e componentes.....	27
2.2.2. Epidemiologia da malária transmitida por transfusão de sangue.	29
2.2.3. Mecanismos de prevenção da malária transmitida por transfusão de sangue.....	32
2.2.3.1. A triagem clínica e epidemiológica de doadores para a prevenção da malária transmitida por transfusão.....	33
2.2.3.2. A triagem laboratorial de doadores para a malária transmitida por transfusão.....	37
2.2.3.3. Métodos alternativos para prevenção da malária transmitida por transfusão.....	40
2.3. A regulamentação brasileira para prevenção da malária transmitida por transfusão.....	43
3. JUSTIFICATIVA.....	46
4. OBJETIVOS.....	49
4.1. Objetivo geral.....	49
4.2. Objetivos específicos.....	49
5. MÉTODOS.....	50
5.1. Determinação da sensibilidade da <i>nested PCR</i> em <i>pool</i> de amostras para detecção do <i>Plasmodium spp</i>	50
5.1.1. Tipo de estudo.....	50
5.1.2. Preparação do <i>pool</i> de amostras.....	50
5.1.3. Microscopia.....	51

5.1.4. Execução da <i>nested PCR</i>	51
5.1.5. Análise dos dados.....	52
5.2. Estimativa da prevalência de infecção por <i>Plasmodium</i> spp e de fatores de risco para malária.....	53
5.2.1. População de estudo.....	53
5.2.2. Execução da <i>nested PCR</i>	54
5.2.3. Coleta, processamento e análise dos dados.....	54
5.3. Avaliação normativa dos serviços de hemoterapia com enfoque na prevenção da transmissão da malária por transfusão.....	55
5.4. Aprovação por comitês de ética em pesquisa com seres humanos.....	57
6. RESULTADOS.....	58
6.1. Artigo 1. Sensibilidade da <i>nested-PCR</i> para detecção de <i>Plasmodium</i> spp em <i>pool</i> de amostras de sangue total e sua utilidade na triagem de doadores de sangue em áreas endêmicas.	58
6.2. Artigo 2. Prevalência de infecção por <i>Plasmodium</i> spp e de fatores de risco para malária em candidatos à doação de sangue da Amazônia Brasileira.....	76
6.3. Artigo 3. Avaliação normativa dos serviços de hemoterapia da região amazônica brasileira para prevenção da malária transmitida por transfusão.....	104
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES.....	128
8. CONCLUSÃO.....	132
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
10. APÊNDICES.....	139
11. ANEXOS.....	155

RESUMO

Introdução: A malária transmitida por transfusão (MTT) é uma doença grave e subnotificada nos países endêmicos para malária. Avaliou-se o risco da MTT em serviços de hemoterapia (SH) da Região Amazônica brasileira (RAB) por meio da estimativa das prevalências de infecção por *Plasmodium* e dos seus fatores de risco (FRMal) em candidatos à doação de sangue. Realizou-se uma avaliação normativa de SH da RAB, com enfoque na prevenção da MTT e calculou-se a sensibilidade de um protocolo de *nested-PCR* aplicado em *pool* de amostras de sangue total. Métodos: Candidatos à doação de sangue, aptos e inaptos pela triagem clínica (TC) e epidemiológica (TE) de quatro SH, foram investigados quanto à presença de FRMal e tiveram uma amostra de sangue coletada para detecção do parasito. *Nested-PCR* em *pool* de cinco amostras foi utilizada para detecção do *Plasmodium*. As prevalências e intervalos de confiança a 95% (IC95%) foram obtidos dos resultados da *nested-PCR* (infecção) e do questionário epidemiológico (FRMal). Para avaliação normativa, utilizou-se questionário semiestruturado que e os SH foram classificados em inadequados, parcialmente adequados e adequados. Resultados: A *nested-PCR* apresentou sensibilidade de 95,2% (IC95%: 76,2% a 99,9%) para detecção de 0,20 parasito/microlitros de sangue. Para o estudo da prevalência e dos FRMal, foram selecionados 2.992 indivíduos (80% aptos e 20% inaptos). A malária foi o principal motivo de inaptidão entre as mulheres, e o segundo entre os homens. Os principais FRMal nos candidatos à doação aptos foram: “moradia/trabalho/estudo em municípios com alto risco para malária” (40,0%: IC95%: 38,0% a 40,2%); “deslocamento para áreas de risco (zona rural/áreas silvestres/garimpos)” (19,3%: IC95%: 17,8% a 21,0%); “duas ou mais malárias na vida” (8,9%: IC95%: 7,8% a 10,1%). Pelos critérios normativos, 42,0% (IC95%: 40,1% a 44,1%) dos aptos relataram FRMal que

os tornariam inaptos à doação no dia da entrevista. A prevalência geral de infecção por *Plasmodium* foi 0,07% (n=2/2.992; IC95%: 0,01% a 0,27%), sendo de 0,04% (IC95%: 0,00% a 0,27%) nos aptos e 0,17% (IC95%: 0,01% a 1,07%) nos inaptos. A mediana geral de pontos entre os SH avaliados na avaliação normativa foi 49,8 (mínimo=16; máximo=78); cinco foram classificados como inadequados e cinco como parcialmente adequados. Conclusões: *Nested-PCR* em *pool* de amostras mostrou-se uma alternativa à gota espessa na triagem laboratorial para malária em SH da RAB. A alta prevalência de exposição aos FRMal nos candidatos à doação de sangue alerta para o risco de gerar desabastecimento se, de fato, todos os expostos aos FRMal fossem considerados inaptos. Portanto, é indicada a utilização de testes de alta sensibilidade na triagem laboratorial da malária. A avaliação normativa mostrou que a adesão às normas para a prevenção da MTT é negligenciada pelos SH. Recomenda-se o aperfeiçoamento das normas vigentes para reduzir o risco de MTT, com a preocupação em não causar desabastecimento de sangue na RAB.

ABSTRACT

Transfusion-transmitted malaria (TTM) is a serious, underreported disease in malaria endemic countries. The aim of this thesis was to evaluate the risk of TTM in blood banks (BB) from the Brazilian Amazon Region (BAR) by estimating the prevalence of Plasmodium infection and its risk factors in blood donors as well as conducting a normative evaluation in BB, focusing on prevention of TTM. Blood donors from four BB were surveyed about the presence of risk factors for malaria and had a blood sample collected for parasite detection. Nested-PCR in pool of five samples, previously validated for these conditions, was used for Plasmodium detection. The prevalence and confidence intervals at 95% (95%CI) of Plasmodium infection and risk factors for malaria were obtained, respectively, based on the results of the nested-PCR and epidemiological questionnaire. The normative evaluation was performed in 10 BB from BAR using semi-structured questionnaire. For each item a score was assigned and the final score of each BB enable us to classify it as inadequate, partially adequate and adequate. The nested-PCR presented a sensitivity of 95.2% (95% CI: 76.2% to 99.9%) for detection of 0.20 parasites/microliter of blood. We surveyed 2,992 individuals, 80% qualified and 20% deferred for donation after the BB clinical and epidemiological screening, to assess the prevalence and risk factors for malaria. Malaria was the main deferring cause among women, and the second among men after BB clinical and epidemiological screening. The main risk factors among qualified donors were housing, work or study in municipalities with high risk for malaria (40.0%: 95%CI: 38.0% to 40.2%) and visiting risk areas (rural, wild areas and mines) (19.3%: 95%CI: 17.8% to 21.0%). In addition, 8.9% (95%CI: 7.8% to 10.1%) reported two or more episodes of malaria in their life. According to the regulations, 42.0% (95%CI: 40.1% to 44.1%) of qualified donors had one or more deferrable risk factors

for donation. The overall prevalence of Plasmodium infection was 0.07% (n=2/2.992, 95%CI: 0.01% to 0.27%) and 0.04% (95%CI: 0.00% to 0.27%) among qualified donors and 0.17% (95%CI: 0.01% to 1.07%) among deferred donors. About normative evaluation, the overall median score was 49.8 (min=16, max=78) Five BB were classified as "inadequate" and five as "partially adequate". Nested-PCR in pooled samples proved to be an option to the thick blood smear for malaria laboratory screening in BB from BAR. The high prevalence of exposure to risk factors for malaria in blood donors highlights the risk of lack of blood supply if all exposed donors were deferred. Therefore, high-sensitivity tests are necessary for malaria laboratory screening. Normative evaluation showed that adherence to standards for the prevention of TTM is neglected by BB because none achieved "adequate" rating. We recommended improvement of current regulations to reduce the risk of TTM, keeping in mind the concerning about lack of blood supply in the BAR.

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma das doenças que mais afeta a humanidade no mundo de hoje. Metade da população mundial vive em áreas onde a malária é endêmica (Seed *et al.*, 2005). É uma doença infecciosa febril aguda causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. As quatro principais espécies de plasmódios que causam a doença são *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*. As três primeiras espécies têm ocorrência mundial e a quarta está restrita ao oeste da África subsaariana. A espécie *P. falciparum* causa a forma mais grave e letal da doença e é a espécie predominante na África (Seed *et al.*, 2005).

Os plasmódios causadores da malária são parasitos intracelulares de hemácias. São transmitidos ao homem pela picada de diversas espécies de mosquitos do gênero *Anopheles*. O período de incubação varia de acordo com a espécie de *Plasmodium*. Para o *P. falciparum*, de 8 a 12 dias; *P. vivax* e *P. ovale*, 13 a 17 dias e *P. malariae*, 18 a 30 dias (Ministério da Saúde, 2010).

As manifestações clínicas da malária estão relacionadas ao ciclo reprodutivo dos plasmódios. São caracterizadas por um período de infecção, que tem o ataque paroxístico como principal sintoma, um período de remissão, que dura 48 horas para infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*, 50 horas para *P. ovale* e 72 horas para *P. malariae*, e um período toxêmico, que pode ocorrer em pacientes que não recebem tratamento adequado e oportuno, podendo evoluir para formas graves (Ministério da Saúde, 2010).

O diagnóstico laboratorial dos casos é feito, em sua imensa maioria, por exames microscópicos de visualização direta do parasito (gota espessa ou esfregaço). Há também testes rápidos baseados em imunocromatografia em fitas de nitrocelulose que detectam antígenos dos plasmódios (Ministério da Saúde, 2010). Mais recentemente, testes para detecção do ácido nucleico (NAT – do inglês *nucleic acid tests*) estão sendo utilizados, em especial para

pesquisas envolvendo portadores assintomáticos de infecção por *Plasmodium* (PAP) (Alves *et al.*, 2002).

A malária é endêmica na Região Amazônica brasileira. Em 2011, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (MS), foram registrados 266.338 casos de malária no Brasil. Destes, 99,7% tem como local provável de infecção a Amazônia Legal. Para o MS, a região endêmica para malária compreende todos os Estados da Região Norte mais os Estados do Maranhão e do Mato Grosso. Essa região engloba toda a Amazônia Legal ou Região Amazônica Brasileira, conforme definido pela Lei Complementar Nº 124, de 03 de janeiro de 2007 (Ministério da Saúde, 2013).

Os protozoários das espécies *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* são os agentes causadores da doença no Brasil. No Brasil, a espécie *Anopheles darlingi* é o principal vetor envolvido na transmissão natural da malária.

Embora menos frequente, a transmissão induzida da malária tem sido relatada por meio de agulhas contaminadas (Andrade & Wanderley, 1991), transplante de órgãos (Yenen *et al.*, 1994) e, principalmente, por transfusão de hemocomponentes (Andrade & Wanderley, 1991) (Olaya de Morales & Espinal Tejada, 1982) (Mungai *et al.*, 2001) (Slinger *et al.*, 2001) (Kitchen *et al.*, 2005). A prevenção da malária transmitida por meio de transfusão de sangue é relevante devido principalmente à gravidade dos casos. Este tema constitui em um grande desafio, em especial para os países e áreas endêmicas, sendo o objeto do presente trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Situação epidemiológica da malária no mundo e no Brasil

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2010 ocorreram 210 milhões de casos de malária no mundo, com 660 mil mortes. Em 2011, 99 (51%) dos 193 países existentes no mundo ainda tinham a malária como endêmica no seu território. Sua importância epidemiológica no cenário mundial é tal que a redução da sua incidência faz parte dos objetivos do milênio. A meta é que os países endêmicos reduzam em 75% o coeficiente de incidência da malária até o ano de 2015. O investimento mundial no controle da malária foi estimado em 1,8 bilhão de dólares americanos em 2012, cerca de 20 vezes mais que a quantia investida em 2000. Contudo, esse valor está ainda longe do estimado como necessário para que se atinja a meta acordada, que é de 5,1 bilhões de dólares americanos anuais (World Health Organization, 2012).

A ocorrência e gravidade da malária estão fortemente associadas à pobreza. A mortalidade devido à malária é maior nos países com Produto Interno Bruto *per capita* mais baixo e nos países com maiores percentuais de pessoas vivendo abaixo do limiar da pobreza (menos de 1,25 dólares por pessoa e por dia) (World Health Organization, 2012).

As estratégias da OMS para controle da malária se baseiam no controle do vetor, na quimioprofilaxia, no diagnóstico e tratamento precoces dos casos e na vigilância. Para controle do vetor, o investimento é na distribuição gratuita de mosquiteiros impregnados com inseticida para os países da África Subsaariana e na pulverização intradomiciliar de inseticidas. O número de mosquiteiros impregnados distribuídos gratuitamente aumentou de seis milhões em 2004 para 145 milhões em 2010. Estima-se que 53% das habitações dos países da África subsaariana possuam pelo menos um mosquiteiro impregnado. Entretanto, nos anos de 2010 e 2011 a quantidade distribuída foi reduzida, o

que provocará a queda na cobertura das habitações (World Health Organization, 2012). A pulverização intradomiciliar de inseticida é uma estratégia recomendada por 80 países, incluindo 38 países da África. Resistência aos inseticidas tem sido reportada em 64 países e a monitorização da resistência é um componente necessário para garantir o sucesso dessa estratégia (World Health Organization, 2012).

No que se refere à quimioprofilaxia como estratégia de controle da malária, a recomendação da OMS é que o tratamento preventivo intermitente com sulfadoxina-pirimetamina seja realizado nas mulheres grávidas e crianças vivendo em áreas de alto risco. Dos 45 países da África Subsaariana, 36 adotaram o tratamento preventivo intermitente como política nacional até 2011. Contudo, em um inquérito realizado em 16 países africanos, apenas 22% das mulheres grávidas haviam recebido o tratamento conforme o protocolo estabelecido (World Health Organization, 2012).

Quanto ao diagnóstico e tratamento precoces como estratégia de controle da malária, vale destacar que os testes rápidos ou leitura microscópica tem ampliado sua cobertura anualmente, o que permite a correta identificação da espécie e o uso racional dos medicamentos. Se todos os casos suspeitos de malária fossem testados e somente os confirmados fossem tratados, adequadamente, haveria redução na necessidade de medicamentos (World Health Organization, 2012). O acesso rápido ao tratamento efetivo da malária é um aspecto central para o sucesso de qualquer programa de controle da doença. Idealmente, o tratamento deve começar dentro de 24 horas após o início dos sintomas. Contudo, a maioria dos países africanos está longe dessa situação (Chuma *et al.*, 2010).

O tratamento a base de derivados das artemisininas é recomendado para todas as infecções por *P. falciparum* e para as infecções por *P. vivax* nos locais com resistência detectada à cloroquina. Todas as infecções por *P. vivax* devem ser tratadas com combinação com primaquina por 14 dias para evitar recaída (World Health Organization, 2012).

O desenvolvimento de resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos é um desafio constante. Resistência do *P. vivax* à cloroquina tem sido relatada em diversos países da América do Sul e Ásia desde a década de 1990 (Gama *et al.*, 2011) (Pasaribu *et al.*, 2013) e resistência de *P. falciparum* às artemisininas tem sido detectada na América do Sul, África e Ásia (Gama *et al.*, 2011). A vigilância de resistência dos parasitos é um ponto crítico para a predição de novas intervenções e definições de protocolos para o tratamento da malária.

Outro ponto crítico na estratégia de controle da malária é a vigilância epidemiológica (VE) que ainda é relativamente frágil nos países onde o peso da malária no sistema de saúde é maior. Portanto, os dados para esses países possuem problemas de completude, e medidas urgentes para melhorar a VE da malária precisam ser tomadas (World Health Organization, 2012).

Em relação ao controle global da malária, 50 países do mundo estão muito próximos de atingir a meta de redução de 75% até 2015. Porém, esses países concentram apenas 3% do total do número de casos no mundo. Já no continente africano, a malária é responsável por verdadeira tragédia (World Health Organization, 2012). Apesar de ser uma doença com métodos de prevenção e tratamento eficazes, e das mortes serem previsíveis, a malária ainda causa a morte de uma criança a cada minuto na África. São 14 países africanos que concentram os 80% dos casos de malária no mundo e 90% de todas as mortes por essa causa (World Health Organization, 2012).

Na região das Américas, estima-se que o número de casos chegou a 1,1 milhão (0,5% dos casos do mundo) com 1.100 mortes. Nesta região, a malária também atinge mais contundentemente as populações rurais e os mais pobres, com dificuldade de acesso aos serviços de saúde (Silva-Nunes *et al.*, 2012). Dos 35 países existentes nas Américas, são 13 os países que já conseguiram atingir a meta de redução em 75% da incidência de casos confirmados de malária em relação a 2000; três países já reduziram em mais de 64% e se projeta que conseguirão atingir a meta em 2015; quatro países reportaram aumento na incidência e se projeta que não conseguirão atingir a meta. O

Brasil apresentou redução pouco acima de 50% e se projeta que não será possível atingir a meta até 2015 (World Health Organization, 2012).

Os nove (9/35=26%) países que possuem uma parte da Região Amazônica em seu território (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela) contribuem com 90% dos casos americanos (Silva-Nunes *et al.*, 2012). É no território brasileiro que está a maior parte da Amazônia e o Brasil é responsável por 55% dos casos registrados de malária na região das Américas.

No Brasil, entre 2000 e 2011, registrou-se uma média de 422 mil casos anuais de malária, sendo que mais de 99% desses ocorreram na região endêmica. Porém, nos últimos cinco anos, observa-se uma redução na média anual para 338 mil casos (Ministério da Saúde, 2013a).

A primeira epidemia de malária registrada na Amazônia brasileira data do fim do século XIX e coincide com a grande imigração de trabalhadores da região Nordeste para a Amazônia em busca de emprego na extração da borracha e construção da ferrovia Madeira-Mamoré. A segunda epidemia veio com a nova onda migratória ocorrida, novamente do Nordeste para a Amazônia, durante a Segunda Guerra Mundial. É curioso observar que, nessa ocasião, os trabalhadores da borracha, chamados de soldados da borracha, sofreram mais baixas devido à malária do que os verdadeiros soldados brasileiros lutando contra o nazismo e fascismo na Europa (Coura *et al.*, 2006). Após esse período, apesar da eliminação da malária em todos os estados do Nordeste brasileiro, exceto Maranhão, bem como das regiões Sul e Sudeste, a doença se torna endêmica na Amazônia brasileira, com cerca de 100 mil casos anuais (Ministério da Saúde, 2010).

No final da década de 70 e década de 80, uma nova onda migratória se iniciou e recordes no número de casos de malária foram registrados nos anos que se seguiram (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Os fatores motivadores desse processo migratório foram a política de ocupação e desenvolvimento da região, com a construção de várias estradas e de hidrelétricas, instalação de garimpos e projetos de colonização urbana e rural. Esse crescimento populacional se

deu de forma desordenada, com aumento de 34,4% da população entre 1980 e 1991 (Ladislau, 2005).

A curva epidêmica da malária na região endêmica, analisada desde a década de 80, apresenta picos e vales, o que demonstra a dificuldade da manutenção do controle da doença na região. No começo dos anos 80, após intensificação da colonização humana da Amazônia, houve um aumento descontrolado do número de casos, culminando com o registro de quase 600 mil casos em 1989 (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010).

Diante deste quadro, o MS alterou sua estratégia de controle. Baseada anteriormente na aplicação do inseticida DDT (diclorodifeniltricloroetano) intradomiciliar e tratamento de casos de febre com cloroquina, o novo Plano Nacional de Controle da Malária trouxe como reorientação o diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos, de acordo com a espécie de *Plasmodium* identificada. Para isso, houve uma intensa ampliação do número de postos de diagnóstico e tratamento da malária na região. O número de casos reduziu dos 600 mil em 1989 para aproximadamente 400 mil em 1997. Contudo, em 1999, um novo número recorde de casos é registrado (637.470 casos) e um novo plano é estabelecido, então denominado Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM). Com o PIACM, reforçou-se ainda mais o foco do controle no diagnóstico e tratamento precoce e adequado dos indivíduos reduzindo o foco do controle ambiental. A drástica redução no número de casos nos anos seguintes parecia indicar o sucesso do PIACM. Todavia, um novo pico é atingido em 2005, com 607.782 casos registrados.

Essas oscilações indicam que – aparentemente - o controle da doença na região não pode estar direcionado para partes isoladas dos fatores que compõem o ciclo e a história natural da malária. Além dos fatores biológicos e de atenção à saúde, os fatores socioeconômicos e os determinantes políticos compõem a complexa rede de causalidade da malária na região e não devem ser ignorados nos planos de controle da doença (Braz *et al.*, 2013).

Novamente, movimentos migratórios intensos para determinadas regiões da Amazônia com ampliação da fronteira agrícola e ocupação desordenada das áreas periféricas de grandes municípios como Manaus, capital do Estado do Amazonas, e Porto Velho, capital do Estado de Rondônia, aliados às mudanças climáticas e aumento da população do mosquito vetor pela formação de criadouros próximos a zona urbana, compõem o rol de explicações para o recrudescimento da malária na região, inclusive em áreas urbanas (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010).

Em 2006, o MS, então, reorganiza a mobilização contra a malária na região, incluindo gestores da saúde nos níveis municipais e estaduais, para priorizar as ações de controle da endemia na agenda de saúde local. Como resultado, uma tendência descendente no número de casos é observada a partir de 2006 (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010), com redução de 56% no número de casos entre os anos de 2005 (607.782 casos) e 2011 (266.348 casos) (Ministério da Saúde, 2013).

A distribuição dos casos segundo sexo e idade também se alterou. Desde 2001, observa-se redução na razão de sexos (masculino VS feminino) de casos de malária na região. Neste ano, a razão de sexos foi de 1,81 e, a partir de 2008, se mantém estável em 1,58. Em relação à distribuição por idade, observa-se um deslocamento dos maiores valores do Índice Parasitário Anual (IPA)¹ para os mais jovens e crianças.

O atual Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) do MS avalia a dinâmica da incidência da doença por meio do IPA. Os valores do IPA são estratificados em três estratos que se traduzem para o PNCM em faixas de risco para malária de acordo com a seguinte classificação: baixo risco (IPA de

¹O IPA (Índice Parasitário Anual) é calculado pela razão entre o número de exames positivos de malária (códigos B50 a B53 da CID-10) e a população exposta em determinado espaço geográfico, no ano considerado. O numerador desse indicador (exames positivos) é uma estimativa do número de casos novos da doença. Embora imperfeito (devido a exames duplicados ou subnotificação de casos), esse indicador é considerado uma proxy do risco de ocorrência de malária, numa determinada população, no período de um ano.

0,1 a 9,9 lâminas positivas de malária por 1.000 habitantes); médio risco (IPA de 10,0 a 49,9) e alto risco (IPA>49,9).

Em 2003, os maiores valores do IPA estavam entre as faixas de 15 a 59 anos de idade. Já em 2011, os maiores valores se concentraram nas crianças até nove anos de idade. Não se sabe exatamente as razões que estão gerando esta alteração no perfil das pessoas atingidas. Uma explicação é que as residências urbanas estão cada vez mais próximas das áreas silvestres e rurais com criadouros naturais e artificiais do mosquito vetor (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Com isso, a transmissão intradomiciliar se intensifica e, por estarem mais tempo em casa, as mulheres e crianças acabam sendo mais expostas aos mosquitos vetores da doença.

Na Região Amazônica brasileira, a malária tem por característica ser fortemente concentrada em pequenas áreas geográficas. Na análise da distribuição espacial, observa-se incremento desse processo de concentração geográfica da transmissão. Nos anos de 2003-2004 e 2008-2009, 10% dos municípios com os maiores valores de IPA acumulavam 67% e 80% dos casos de malária, respectivamente (Duarte *et al.* dados não publicados). Outro dado é que em 2011, 98% dos casos ocorreram em apenas seis Estados (Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, Amapá e Roraima) (Ministério da Saúde, 2013a). A análise do mapa da área endêmica, com a estratificação das áreas de transmissão de malária segundo as faixas de risco do IPA, mostra que, ao longo do tempo, os municípios com os maiores valores do IPA se concentram na Amazônia ocidental, em especial nos municípios com áreas especiais (garimpos, reservas indígenas e assentamentos rurais), novas fronteiras agrícolas e com ocupação desorganizada nas periferias (Silva-Nunes *et al.*, 2012).

A proporção de casos segundo a espécie de *Plasmodium* também vem se alterando ao longo do tempo, com expressiva redução proporcional de casos de malária por *P. falciparum*. Por exemplo, em 1988, a proporção de casos de malária por *P. falciparum* em relação a *P. vivax* era de 50% (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). A partir de 1988, a proporção decai sistematicamente até atingir

apenas 11,9% em 2011 (Ministério da Saúde, 2013a). Essa alteração pode ter sido resultado de vários fatores. Entre eles, da implantação do Plano Nacional de Controle da Malária, a partir de 1989, que intensificou o diagnóstico e tratamento precoce dos casos de malária. Como os gametócitos do *P. falciparum* surgem na corrente sanguínea após 10 dias da infecção, o tratamento nos primeiros dias dos sintomas interrompe o ciclo de transmissão para o mosquito. O mesmo não acontece com *P. vivax*, que libera gametócitos na corrente sanguínea desde os primeiros dias da infecção (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010).

Em relação à gravidade da doença, os coeficientes de letalidade, bem como o número de hospitalizações por malária, vêm diminuindo desde a década de 1990. Em 1994, ocorreram 53.450 internações por malária, enquanto que, em 2009, foram 4.442. Para os óbitos, a queda foi de 897 em 1984 para 58 em 2009 (coeficiente de letalidade = de 0,013%) (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Isso também pode estar associado à estratégia de diagnóstico e tratamento precoce dos casos, em especial para as infecções por *P. falciparum*, e pode ser considerada a mais importante vitória na luta contra a malária na Região Amazônica brasileira.

Por outro lado, desde o começo da década de 1990 vem aumentando o número de casos graves de malária por *P. vivax* (Alexandre *et al.*, 2010). Esses casos graves se associam muitas vezes com complicações clínicas incomuns como a trombocitopenia grave (<50.000 plaquetas/mm³), levando a um aumento no número de internações e no coeficiente de letalidade da malária causada por essa espécie de *Plasmodium* (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Esse tema tem sido considerado um novo desafio no controle da doença.

Embora o PNCM não inclua a eliminação da malária na Amazônia entre os seus objetivos, esta ainda continua sendo uma de suas motivações. Além disso, o PNCM aponta como um dos objetivos manter a ausência da transmissão da doença nos locais onde ela tiver sido interrompida. Contudo, para além dos desafios ambientais, socioeconômicos e demográficos que caracterizam a região, o surgimento de resistência do *Plasmodium* aos

medicamentos utilizados atualmente e a presença dos PAP se somam a gama de variáveis para o enfrentamento da endemia.

As infecções assintomáticas tornam-se mais frequentes, normalmente, após infecções múltiplas pelo *Plasmodium*. Ao contrário das doenças virais, em que uma infecção é suficiente para levar o indivíduo à proteção imunológica para aquele vírus por um longo período de tempo, a imunidade contra o *Plasmodium* demora a ser adquirida, normalmente não dura muito tempo quando na ausência de estímulo (contato com o antígeno) e não é totalmente protetora. Essa imunidade natural pode levar anos para ser alcançada e depende da exposição repetida à infecção pelo parasito. Indivíduos com infecções repetidas pelo *Plasmodium* podem desenvolver imunidade protetora contra a doença clínica, mas não contra a infecção (Seed *et al.*, 2005). Em regiões holoendêmicas e hiperendêmicas, a imunidade parcial já começa na infância (após seis anos de idade e sujeito a intensa exposição) e observa-se que a parasitemia é claramente reduzida nos doentes com idades maiores. O parasito continua a se multiplicar, mas em equilíbrio com o sistema imune. A intensidade é tão baixa que os parasitos não são detectados pelos testes convencionais e não causam mais os sintomas clássicos da malária nos adolescentes e adultos (Coura *et al.*, 2006).

Os PAP têm especial importância na manutenção da transmissão do parasito para os vetores (Alves *et al.*, 2005). No Brasil, a prevalência dessa condição na população varia muito. Foi encontrado que 70% dos mineradores de uma região do Mato Grosso eram PAP (Andrade *et al.*, 1995); em comunidades ribeirinhas de Rondônia foram encontradas prevalências de 6,4% a 64,8% para essa condição (Alves *et al.*, 2005); já em áreas urbanas de Porto Velho (RO) a prevalência alcançou valores tão altos quanto 26% em adultos (Tada *et al.*, 2012).

Além de sua importância na manutenção do ciclo biológico do *Plasmodium*, os PAP também têm especial relevância na transmissão por meio de transplantes e da transfusão de sangue e seus componentes. Na Região Amazônica brasileira, a alta prevalência de PAP, aliada aos altos valores do IPA em

algumas localidades, ampliam a disponibilidade de doadores assintomáticos. Esses indivíduos são um desafio para a triagem de doadores de sangue e representam um importante risco para a ocorrência de malária transmitida por transfusão (MTT).

2.2. Malária transmitida por transfusão de sangue

2.2.1. Mecanismos biológicos da transmissão natural da malária e por transfusão de sangue e componentes

Na infecção natural pelo *Plasmodium*, os esporozoítos liberados pelo mosquito na corrente sanguínea invadem os hepatócitos e se desenvolvem em um ciclo denominado hepático ou exoeritrocitário. Nos hepatócitos os esporozoítos se desenvolvem em esquizontes que, ao se romperem, liberam milhares de merozoítos na corrente sanguínea. Os merozoítos invadem as hemácias e se desenvolvem novamente em esquizontes, dando início ao ciclo eritrocitário. A cada 48 horas (50 horas para *P. ovale* e 72 horas para *P. malariae*), esquizontes de *P. vivax* e *P. falciparum* se rompem, destruindo a hemácia parasitada e liberando mais merozoítos na corrente sanguínea. Cada esquizonte libera oito (*P. ovale* e *P. malariae*) ou 16 (*P. vivax* e *P. falciparum*) merozoítos. Alguns esquizontes eritrocitários dão origem a gametócitos (formas sexuadas masculinas e femininas do parasito) que, ao serem sugados pelos *Anopheles*, dão continuidade ao ciclo sexuado nos mosquitos.

Para transmitir a MTT, é necessário que o hemocomponente transfundido possua hemácias com esquizontes. Por isso, casos de MTT são mais frequentemente causados após a transfusão de concentrado de hemácias ou sangue total. No entanto, há relatos de casos após transfusão de concentrado de plaquetas, de concentrado de leucócitos e, muito raramente, por crioprecipitados, provavelmente pela contaminação desses hemocomponentes por hemácias. Há também raros relatos de transmissão por transfusão de concentrado de hemácias congeladas. Por outro lado, não há casos

transmitidos por transfusão do plasma fresco congelado ou por hemoderivados (albumina, fatores de coagulação, imunoglobulinas) (Kitchen & Chiodini, 2006). O receptor transfundido com um hemocomponente que possua hemácias parasitadas com esquizontes dos plasmódios vai receber essas hemácias na corrente sanguínea que podem se romper em menos de 48 horas, a depender da maturidade em que os esquizontes se encontravam no doador. Portanto, dependendo da quantidade de hemácias parasitadas transfundidas, o início dos sintomas pode ser semelhante ao do ciclo natural da doença (em torno de 15 dias). Por outro lado, como não há ciclo hepático na MTT, pois não há esporozoítos envolvidos, o período de incubação pode ser maior que no ciclo natural se a concentração de hemácias parasitadas transfundidas for muito pequena, pois o ciclo eritrocitário terá que se repetir por mais vezes, em comparação com a infecção natural, para que a concentração parasitária seja tal que provoque os sintomas.

De fato, o período de incubação da MTT pode variar de 8 a 36 dias (mediana de 16 dias) para *P. falciparum*, de 11 a 42 dias para *P. vivax* (mediana de 17 dias) e de 8 a 90 dias (mediana de 48 dias) para *P. malariae* (Mungai *et al.*, 2001) e provavelmente depende da dose de parasitas que foi injetada. Esse período eventualmente alongado é uma das dificuldades para a suspeita diagnóstica de MTT, podendo levar ao retardo do tratamento específico e a casos graves e letais.

Não há consenso sobre a mínima dose infectante de plasmódios para causar a MTT. Em camundongos, a mínima dose infectante de plasmódios (*P. chabaudi*) para transmissão induzida foi de 100 parasitos (Kitchen & Chiodini, 2006). Há autores que defendem que, para humanos, a dose mínima infectante é de 10 parasitos (Seed *et al.*, 2005). Como uma bolsa de concentrado de hemácias possui aproximadamente 250 mL, um indivíduo com muito baixa parasitemia (por exemplo, com 0,001 parasito/ μ L ou 1,0 parasito/mL), que doasse uma bolsa de sangue total, produziria uma bolsa de concentrado de hemácias com uma dose de 250 parasitos, o que seria suficiente, em teoria,

para causar a infecção se transfundida completamente no receptor. Pode-se argumentar ainda que a infectividade do *Plasmodium* se reduz durante o armazenamento a baixas temperaturas (4°C para o concentrado de hemácias) e que, portanto, a mínima dose infectante deve ser maior na medida em que se amplia o tempo de armazenamento. Apesar desse raciocínio, no Reino Unido, um caso de MTT ocorreu mesmo após 19 dias de armazenamento da bolsa de sangue total (Seed *et al.*, 2005).

O tratamento da MTT difere do tratamento da infecção natural apenas para as drogas hipnozoitílicas, pois – como já comentado - não há a formação de hipnozoítos na MTT. Por outro lado, a formação de gametócitos ocorre normalmente e o paciente de MTT pode transmitir o parasito para o mosquito vetor (Kitchen *et al.*, 2005).

2.2.2. Epidemiologia da malária transmitida por transfusão de sangue

A malária foi uma das primeiras doenças reconhecidas como transmissível por transfusão de sangue (Kitchen & Chiodini, 2006). O primeiro caso de malária transmitida por transfusão foi descrito em 1911 (Wollsey, 1911) e ainda hoje a malária permanece como uma das doenças parasitárias de maior preocupação e incidência na hemoterapia (Nansseu *et al.*, 2013).

Em áreas endêmicas, é provável que ocorra subnotificação de casos devido a diferentes razões, tais como a hemovigilância precária ou a sua ausência, as dificuldades relacionadas à rastreabilidade dos hemocomponentes ou pela dificuldade de distinguir casos induzidos de casos da infecção natural (Fujikaha *et al.*, 2007).

Apesar de raros, os casos de MTT são usualmente muito graves (Mungai *et al.*, 2001) (Purdy *et al.*, 2004). A letalidade varia em função da espécie de *Plasmodium*, sendo que os casos por *P. falciparum*, assim como na infecção natural, apresentam maior morbidade e letalidade (Seed *et al.*, 2005). Contudo,

casos graves de MTT por *P. vivax* vem sendo reportados em neonatos (Prashanth *et al.*, 2012)(Echeverri *et al.*, 2012).

Nos Estados Unidos, entre 1963 e 1999, a letalidade encontrada entre os casos de MTT chegou a 11% (10/93) (Mungai *et al.*, 2001). Neste mesmo estudo, dos 33 casos de MTT causadas por *P. falciparum*, seis foram a óbito (18%). Já para *P. vivax* e *P. malariae*, a letalidade foi de 8% para cada espécie. Na França, entre 1999 e 2006 foram relatados três casos de MTT, todos por *P. falciparum* e fatais (Garraud *et al.*, 2008). Na Inglaterra, de 1986 a 2006 foram registrados cinco casos de MTT, todos por *P. falciparum*, com dois óbitos (40%) (Kitchen *et al.*, 2005). Outros importantes fatores que afetam a letalidade da MTT são a gravidade da doença de base e a idade do receptor, assim como tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico e tratamento da doença (Mungai *et al.*, 2001) (Seed *et al.*, 2005) (Kitchen *et al.*, 2005).

Como mencionado anteriormente, o risco de transmissão da malária por transfusão é pouco conhecido e provavelmente subestimado (Candolfi, 2005), em especial nos países endêmicos onde a hemovigilância ainda está em desenvolvimento. Por outro lado, nos Estados Unidos, onde não há malária endêmica, o número médio de casos notificados de MTT é de três casos por ano (Purdy *et al.*, 2004), com uma incidência média de 0,25 casos por milhão de transfusões (Pompera *et al.*, 2003). Na França, entre 1990 e 2006, o risco de ocorrência de MTT foi de 7,5 casos para cada milhão de transfusões (Garraud *et al.*, 2008). Contudo, com o aumento dos deslocamentos internacionais, torna-se mais frequente a exposição de indivíduos de países indenes a áreas endêmicas, com o conseqüente aumento da prevalência de doadores infectados.

Nos países endêmicos, estima-se que a incidência exceda 50 casos por milhão de transfusão (Seed *et al.*, 2005). No Brasil, segundo dados do Sistema de Notificações em Vigilância Sanitária (Notivisa), desde que se iniciou o Sistema Nacional de Hemovigilância (SNH) em 2002 (Freitas *et al.*, 2010), foram notificados apenas quatro casos de MTT, sendo três em 2006, no Estado de Rondônia, e um em 2007, no Estado do Amazonas. Estima-se que, apenas na

Região Amazônica brasileira, sejam realizadas cerca de 300 mil transfusões por ano, o que resultaria em 15 casos por ano, se considerar a estimativa acima. Todos os casos notificados foram causados por *P. vivax* e todos evoluíram para óbito² (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009). Os três casos que ocorreram no Estado de Rondônia eram neonatos, transfundidos com concentrado de hemácias fracionado, oriundo de um único doador. Existe relato que este doador apresentou sintomas da malária alguns dias após a doação e não comunicou o serviço de hemoterapia (SH). Segundo o relatório interno de investigação, o SH relatou que o doador foi submetido ao teste parasitológico que resultou negativo.

Todos os casos notificados no SNH ocorreram na região amazônica. Recentemente, em 2011, foi publicado o relato de um caso de MTT por *P. malariae* fora da região amazônica, no estado de São Paulo (Scuracchio *et al.*, 2011). Porém, este caso não foi notificado ao SNH e não consta no Relatório de Hemovigilância 2007 a 2011 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012).

A prevalência de doadores de sangue com exame laboratorial positivo para *Plasmodium* sp varia em função da prevalência de malária na população do local pesquisado e com o tipo de teste utilizado. Um trabalho de 1998, com 1.481 doadores em áreas com diferentes intensidades de transmissão de malária, não encontrou doadores positivos para *Plasmodium* sp em nenhuma das áreas investigadas, utilizando testes de visualização direta do parasito (QBC Test® e gota espessa) (Sáez-Alquézar *et al.*, 1998). Contudo, estudos realizados na Região Amazônica brasileira, utilizando NAT para detecção do *Plasmodium*, relatam percentuais de positividade em doadores assintomáticos de até 3% (Fujikaha *et al.*, 2007)(Torres *et al.*, 2006)(Batista-dos-Santos *et al.*,

² Até 28 de fevereiro de 2014, existiam somente quatro casos notificados de MTT no Notivisa. A ficha de notificação aponta que os quatro casos evoluíram para óbito e indicam a malária como causa básica. Para a correta confirmação dessa informação, será importante a realização de um estudo do tipo relato de caso, com o objetivo de analisar a trajetória terapêutica desses casos, incluindo a revisão dos prontuários e declaração de óbito.

2012). Portanto, como já referido, é plausível assumir que exista subnotificação de MTT no SNH.

2.2.3. Mecanismos de prevenção da malária transmitida por transfusão de sangue

Para se compreender os mecanismos de prevenção da MTT é necessário se familiarizar com o ciclo produtivo do sangue. A figura 1 apresenta as principais etapas desse ciclo. O ciclo começa com o cadastramento e identificação do doador no SH, e se segue com três etapas de triagem, a saber: 1) Triagem clínica: compreende a medição e a avaliação médica de parâmetros biológicos do doador para avaliar a sua saúde e evitar eventos adversos pela doação. São medidos a pressão arterial sistêmica, pulso, peso, altura, temperatura axilar e o hematócrito. 2) Triagem Epidemiológica: nessa etapa o doador responde a um questionário padronizado para avaliação do risco de transmissão de doenças pelo sangue ao receptor. 3) Triagem laboratorial: se aprovado nas etapas anteriores, o doador segue para a doação do sangue que permitirá a triagem laboratorial. Para tanto, amostras de sangue são coletadas do doador no momento da doação para serem testadas contra as doenças transmissíveis pelo sangue e para a caracterização imunoematológica. No Brasil, nesta etapa, são obrigatórios os testes para detecção de infecção por HIV 1 e 2, HCV, HBV, HTLV 1 e 2, para a sífilis, a doença de Chagas e, para as áreas endêmicas, a malária (Ministério da Saúde, 2013b).

A utilização de critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais para a triagem de doadores de sangue é a principal conduta da hemoterapia para reduzir o risco de transmissão de doenças pelo sangue. Em particular, a prevenção da MTT se dá em todas essas três etapas de triagem. Assim, os critérios de triagem devem ser capazes de excluir da doação os indivíduos infectados que apresentam ou não sintomas da malária. As três etapas de triagem serão detalhadas a seguir.

2.2.3.1. A triagem clínica e epidemiológica para a prevenção da malária transmitida por transfusão

A febre é o sintoma mais característico da malária. A aferição da temperatura corporal e a investigação de febre nos dias que antecederam à doação são requisitos obrigatórios em qualquer SH, pois previnem a transmissão de várias doenças virais, bacterianas e parasitárias.

Os indivíduos febris no momento da doação ou com relato de febre nos dias anteriores à doação são considerados inaptos. Portanto, os indivíduos sintomáticos da malária serão excluídos por esse critério clínico de exclusão.

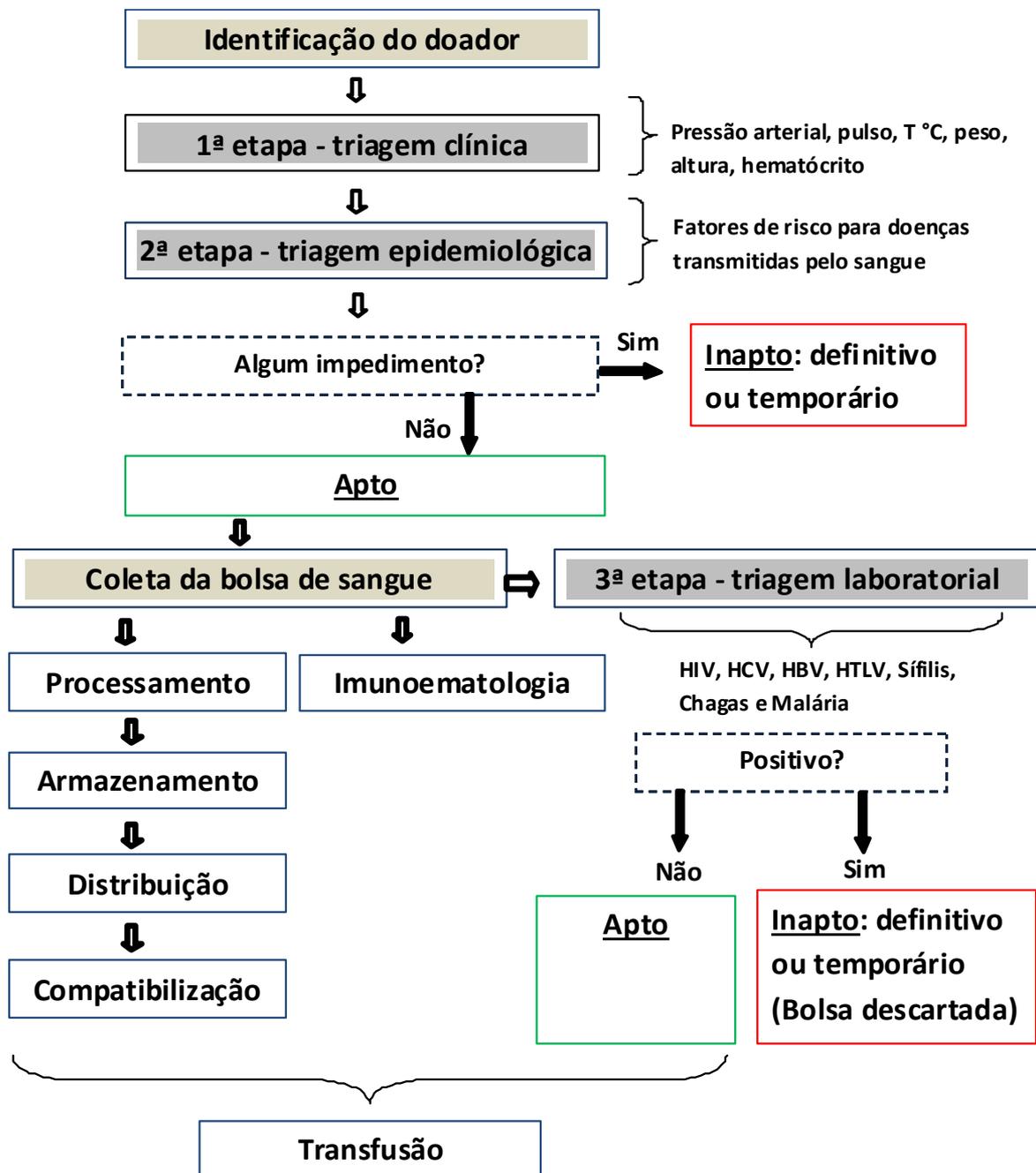
Para os indivíduos assintomáticos, os critérios de seleção devem ser capazes de identificar e impedir a doação de dois tipos de indivíduos, a saber: os indivíduos que estão em período de incubação para malária e os PAP. Essas duas situações representam um grande desafio para a hemoterapia, no que se refere aos critérios de seleção dos doadores. Por exemplo, como referido anteriormente, a mínima dose infectante pode ser tão baixa que indivíduos no período de incubação da malária podem transmitir a doença com facilidade. Ainda, a persistência de parasitos no organismo dos PAP pode chegar a períodos tão longos quanto 53 anos para *P. malariae*, 27 anos para *P. vivax* e 13 anos para *P. falciparum*, muito embora, na grande maioria dos indivíduos, esse período não ultrapasse 2 anos para *P. falciparum* e 3 anos para *P. vivax* (Seed *et al.*, 2005).

Nos países endêmicos, os critérios clínicos e epidemiológicos de seleção para impedir a doação de indivíduos com risco de infecção por *Plasmodium* são altamente sensíveis e pouco específicos (Shehata *et al.*, 2004). No geral, a exclusão de candidatos à doação é feita com base nos deslocamentos para áreas de risco e na história clínica de infecção anterior por malária.

Nos Estados Unidos, ficam impedidos de doar por 12 meses os indivíduos assintomáticos que viajaram para regiões endêmicas e por três anos se moraram em regiões endêmicas. Indivíduos que adoeceram por malária ficam

impedidos de doar sangue por três anos após o final do tratamento e ausência de sintomas; não são realizados testes laboratoriais de triagem para malária. No Canadá, os critérios epidemiológicos são semelhantes aos critérios norte-americanos. Contudo, os indivíduos com história de malária estão definitivamente impedidos de doar componentes celulares.

Figura 1. Componentes básicos do ciclo produtivo do sangue no Brasil.



Na Europa, indivíduos assintomáticos com deslocamentos para regiões endêmicas ficam impedidos de doar sangue por seis meses. Indivíduos que moraram em regiões endêmicas dentro dos primeiros cinco anos de vida ficam impedidos de doar por três anos após a última visita a uma área endêmica. Sujeitos com história de malária ou com sintomas de malária após deslocamento para área endêmica ficam impedidos de doar sangue por três anos após o tratamento e/ou ausência de sintomas. Em todos os casos acima, o tempo de inaptidão é reduzido para quatro meses se forem realizados testes sorológicos ou moleculares e os resultados forem negativos; se os testes sorológicos forem positivos, o indivíduo está definitivamente impedido de doar sangue. A França adota medidas ainda mais restritivas que os demais países da Europa. Para os franceses – assim como para os canadenses –, indivíduos com história de malária na vida ficam definitivamente impedidos de doar componentes celulares, independentemente do resultado da triagem laboratorial.

Esses critérios causam impactos econômicos ao sistema de sangue. Nos Estados Unidos, estima-se que 50.000 doações são impedidas tendo como causa o risco de malária (Mungai *et al.*, 2001). No Canadá, o impacto da exclusão de candidatos à doação potencialmente infectados pelo *Plasmodium*, baseados apenas na avaliação dos fatores de risco, também representa alto custo anual (Shehata *et al.*, 2004). Mesmo assim, essa alta sensibilidade não afeta de maneira importante a disponibilidade de sangue.

Já no contexto de países endêmicos, critérios epidemiológicos de seleção muito sensíveis podem gerar desabastecimento de sangue em alguns locais.

Na África subsaariana, a maioria dos países não adota critérios clínicos e epidemiológicos de exclusão de candidatos à doação por risco de infecção por malária. É fato que muitos países dessa região não possuem estoque de sangue suficiente para atender a demanda e que a prevalência de doadores com malária pode chegar a 30% (Owusu-Ofori *et al.*, 2010) (Nansseu *et al.*, 2013). Portanto, para alguns países, não parece haver saída imediata senão

aceitar que a transfusão de sangue contaminado pelo *Plasmodium* é um mal menor que o desabastecimento.

Na América do Sul, os países com áreas endêmicas no seu território adotam critérios de seleção diferentes para as áreas endêmicas e para as áreas indenes. Na Colômbia, não há critérios epidemiológicos para a seleção dos doadores nos SH das áreas endêmicas, mas todos são submetidos à triagem laboratorial com o teste da gota espessa. Nos SH das áreas indenes deste país, as normas técnicas exigem que os indivíduos que visitaram áreas endêmicas sejam impedidos de doar por 12 meses e os que moraram nas áreas endêmicas sejam impedidos por três anos (Echeverri *et al.*, 2012).

Na Venezuela, os candidatos à doação das áreas endêmicas são avaliados quanto à presença de sintomas, e a triagem laboratorial não é realizada em todos os SH (Contreras *et al.*, 2011). Já nas áreas indenes, os candidatos à doação que se deslocaram para áreas endêmicas ficam impedidos de doar por seis meses.

No Peru, a história de malária e ser imigrante de países endêmicos são motivos de inaptidão do doador por três anos. Além disso, os deslocamentos para áreas endêmicas inabilita o indivíduo à doação por 12 meses. A triagem laboratorial não é obrigatória no Peru (Peru. Ministerio de la Salud, 2004).

O Brasil também adota critérios de seleção diferentes para as áreas endêmicas e indenes. Os detalhes dos critérios de seleção de doadores para malária e a evolução das regulações estão descritos a seguir no subcapítulo 2.3. (“A regulamentação brasileira para prevenção da MTT” adiante).

2.2.3.2. A triagem laboratorial para a prevenção da malária transmitida por transfusão

A triagem laboratorial para malária de doadores de sangue é outro desafio a ser enfrentado pelos SH especialmente nas áreas endêmicas.

Os métodos de detecção indireta da infecção (anticorpos) contra o *Plasmodium* são indicados para os países onde a malária não é endêmica (Kitchen &

Chiodini, 2006). Eles têm sido empregados na Europa, Nova Zelândia e Austrália como complemento à triagem clínica e epidemiológica com o objetivo de reduzir o tempo de inaptidão de candidatos à doação expostos a áreas de risco de transmissão de malária (Seed *et al.*, 2005).

No entanto, a efetividade do uso de testes sorológicos em áreas endêmicas é questionada (Kitchen & Chiodini, 2006) (Seed *et al.*, 2005). A resposta imunológica aos plasmódios é um fenômeno complexo. O sistema imunológico apresenta respostas variadas tanto no estágio pré-eritrocítico como no estágio eritrocítico e envolve uma diversidade de classes e subclasses de imunoglobulinas, bem como um número elevado de citocinas (Leoratti, 2004).

Além disso, anticorpos anti-*Plasmodium* podem permanecer circulantes por décadas (Kitchen & Chiodini, 2006). Em um estudo com 270 indivíduos residentes na área endêmica brasileira, encontrou-se que as maiores concentrações de anticorpos da classe IgG (subclasses 1, 2 e 3) anti formas eritrocitárias do *P. falciparum* ocorreram nos indivíduos não infectados (resultando em diagnósticos falsamente positivos para a infecção) no momento da coleta do sangue em comparação com os infectados. Como esperado, a frequência de amostras positivas foi maior nos indivíduos com maior número de infecções prévias de malária (Leoratti, 2004). Os autores concluíram que a triagem laboratorial em áreas endêmicas baseada em anticorpos IgG pode levar à exclusão de indivíduos menos susceptíveis à infecção por apresentarem alguma imunidade protetora após diversas exposições ao *Plasmodium*.

Em relação aos anticorpos das classes IgA, IgE e IgM, esse mesmo estudo também encontrou que a frequência de indivíduos com resultados positivos é maior no grupo dos não infectados (Leoratti, 2004).

Em áreas endêmicas, a depender da prevalência de positividade na população, a utilização de métodos de detecção de anticorpos na triagem laboratorial dos doadores de sangue pode gerar desabastecimento (Seed *et al.*, 2005). Além disso, os testes de detecção indireta não permitem a detecção de anticorpos no período de incubação ou mesmo nos primeiros dias de sintomas da doença

(Kitchen & Chiodini, 2006), o que resultaria em testes com resultados falsamente negativos.

Dada a limitação dos testes sorológicos, para áreas endêmicas, é indicado que a triagem laboratorial para malária seja realizada com métodos de detecção direta do parasito (Seed *et al.*, 2005). Os métodos de visualização direta dos plasmódios tradicionalmente utilizados para detecção de casos de malária são os exames microscópicos das lâminas de sangue corados com Giemsa ou Giemsa com azul de metileno (Walker) ou solução de Wright. As lâminas podem ser preparadas em esfregaço ou gota espessa. Também é comum o uso do alaranjado de acridina, que pode ser aplicado em lâminas ou em tubos capilares, chamados de testes QBC®.

Mais recentemente, testes rápidos imunocromatográficos vêm sendo amplamente utilizados. Estes testes detectam antígenos plasmodiais circulantes no sangue dos infectados. Os antígenos mais utilizados são a proteína rica em histidina (HRP-2), a desidrogenase láctica plasmodial (pLDH) e aldolase.

Testes de detecção de ácidos nucleicos (NAT) ainda não são comuns para diagnóstico da malária, mas têm sido empregados em estudos epidemiológicos de PAP (Alves *et al.*, 2005) e sugeridos como relevantes na triagem laboratorial de doadores de sangue (Shehata *et al.*, 2004) (Torres *et al.*, 2006) (Fujikaha *et al.*, 2007) (Batista-dos-Santos *et al.*, 2012). De fato, estudos têm demonstrado que testes de visualização direta de plasmódios, realizados em portadores assintomáticos, apresentam desempenho inferior aos NAT (Alves *et al.*, 2002) (Proux *et al.*, 2011) (Ndao *et al.*, 2004). Em um estudo com ribeirinhos da Região Amazônica brasileira, a detecção de *Plasmodium* sp pela reação em cadeia da polimerase (PCR - do inglês *polymerase chain reaction*) foi cerca de sete vezes maior que pela microscopia (Alves *et al.*, 2002). Os autores deste estudo concluíram que indivíduos assintomáticos que apresentam baixa parasitemia podem explicar o baixo desempenho da microscopia na detecção de *Plasmodium* sp para esses indivíduos. Ainda assim, nos países endêmicos que realizam a triagem laboratorial para a malária nos doadores de sangue, a

gota espessa é sem dúvida o teste mais utilizado (World Health Organization, 2010).

Se por um lado, os métodos tradicionais de detecção direta do parasito (gota espessa, QBC® ou testes imunocromatográficos) são pouco sensíveis e não garantem a segurança necessária para a detecção dos casos assintomáticos, que geralmente possuem baixa parasitemia, por outro, a utilização de NAT, que possuem alta sensibilidade, ainda tem custo elevado e pode ser inacessível para a realidade econômica da maioria dos países endêmicos. Assim, o uso de NAT com estratégias mais custo efetivas (por exemplo, em *pool* de amostras) deve ser avaliado. Além disso, outras estratégias para além dos métodos convencionais de seleção dos doadores têm sido sugeridas para as regiões endêmicas. Entre elas estão a profilaxia para a malária nos receptores e as técnicas para reduzir ou eliminar o *Plasmodium* nas bolsas de sangue por meios químicos ou físicos.

2.2.3.3. Métodos alternativos para prevenção da malária transmitida por transfusão

Várias são as estratégias alternativas já experimentadas ou recomendadas em diferentes locais do mundo para a prevenção da MTT. Entre elas destacam-se a profilaxia universal de receptores e a adição de substâncias químicas ou irradiação capazes de matar o *Plasmodium*.

A profilaxia universal dos receptores, ou minimamente para aqueles de alto risco para a malária, tem sido recomendada por diversos autores e pela OMS (World Health Organization, 2010) para os países holoendêmicos e hiperendêmicos da África subsaariana (Nansseu, et al., 2013), onde a prevalência de doadores positivos para malária pode chegar a 55%. Nestas áreas, entende-se que os danos causados pelo desabastecimento de sangue superam os riscos associados à profilaxia para a malária nos pacientes. Por outro lado, os custos dessa medida para o sistema hemoterápico podem ser proibitivos para alguns países nessa situação. No Quênia, uma análise de

custo da profilaxia universal, realizada em 2005, encontrou que cada paciente custaria US\$ 7,79 para o tratamento com artemisinina (Rajab *et al.*, 2005).

Outra estratégia é a adição de substâncias químicas (violeta Genciana, medicamentos entre outras) ou irradiação das bolsas de sangue. Essa medida tem sido explorada há algum tempo por diversos pesquisadores com a intenção de eliminar os plasmódios.

A adição de violeta Genciana teve sua eficácia comprovada como agente químico capaz de eliminar o *Plasmodium* de hemácias infectadas (Amato-Neto *et al.*, 1987) (Yang *et al.*, 1988). Contudo, por sua toxicidade mitocondrial em ratos (Docampo *et al.*, 1988) e seu potencial carcinogênico em camundongos (Littlefield *et al.*, 1985), seu uso não é recomendado nem mesmo para produtos cosméticos (Diamante *et al.*, 2009).

A adição de medicamentos utilizados para a profilaxia ou o tratamento da malária também é sugerida para eliminar o parasito das bolsas de sangue.

Por exemplo, a adição de sulfadoxina-piremetamina foi capaz de eliminar 100% dos *P. falciparum* de 30 bolsas de sangue total humano após 48 horas de armazenamento a 4º C (Ali & Kadaru, 2005). A dose letal para os plasmódios a 99% (DL99%) após 48 horas de armazenamento se mostrou segura para os pacientes e não afetou significativamente as características do sangue. Há, porém, preocupações que devem ser ressaltadas, como a resistência do *P. falciparum* às drogas e o conseqüente aumento necessário da dose letal para se alcançar a mesma eficácia (Ali & Kadaru, 2005) que, ao mesmo tempo, deve ser segura para o receptor do sangue. Soma-se a isso o fato de que a droga não tem ação contra *P. vivax*, que é a espécie predominante nas Américas.

A adição de cloroquina ou quinina também tem sido sugerida e enfrenta as mesmas limitações da sulfadoxina-piremetamina quanto ao surgimento de resistência. Além disso, são drogas que necessitam ser administradas por longo período, pois tem ação estágio-específico e podem não apresentar a eficácia adequada para reduzir a MTT (Seed *et al.*, 2005).

A irradiação do sangue com raios gama também é uma medida sugerida para eliminar os plasmódios das bolsas de sangue (Braz *et al.*, 1998).

Hemocomponentes irradiados com raios gama, particularmente o concentrado de hemácias, são amplamente utilizados na medicina transfusional. O objetivo da irradiação é eliminar ou reduzir a concentração de leucócitos na bolsa, o que é muito útil em algumas situações especiais. Em pacientes imunossuprimidos, a transfusão de leucócitos pode provocar o desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro, que é muito grave e pode levar a óbito. Apesar de ser um procedimento seguro para o receptor, em um estudo sobre o efeito da irradiação no sangue total de camundongos contendo *P. berghei*, os autores verificaram que a técnica não foi capaz de impedir a transmissão do parasito, mesmo com doses de irradiação acima do limite aceitável para preservar a integridade das células sanguíneas (Braz *et al.*, 1998).

Recentemente, outras técnicas de irradiação têm sido testadas para eliminar parasitas, bactérias e vírus dos hemocomponentes. Trata-se da irradiação com raios ultravioleta (UV) após a adição de algum componente fotossensível. O azul de metileno tem sido usado para inativação viral do plasma enquanto que psoralen ou riboflavina têm sido aplicadas para o concentrado de plaquetas (Solheim, 2008). A adição de riboflavina seguida de irradiação com raios UV também se mostrou eficaz na redução da parasitemia de *P. falciparum* de bolsas de concentrado de hemácias (El Chaar *et al.*, 2013). A conclusão dos autores é de que esta técnica poderia ser aplicada em áreas com alta endemicidade, onde os métodos de seleção dos doadores não podem ser adequadamente aplicados.

No Brasil, nem a profilaxia pré-transfusional para malária nem a adição de substâncias ou a irradiação das bolsas foram adotadas como técnicas para evitar a MTT. Toda a regulação sanitária brasileira para prevenção da MTT é baseada nas técnicas de seleção de doadores, ou seja, na triagem clínica e epidemiológica, e na triagem laboratorial, por meio de testes laboratoriais de detecção direta do *Plasmodium* ou seus antígenos.

2.3. A regulamentação brasileira para prevenção da malária transmitida por transfusão

No Brasil, os requisitos sanitários para seleção de doadores começaram a ser estabelecidos em 1965, com a Lei n° 4.701/1965. Na seção Apêndice (Apêndice 1) é apresentado um quadro com o resumo das normas e legislações, de 1950 a 2013, para prevenção da malária transmitida por transfusão de sangue e componentes no Brasil.

Os primeiros critérios de seleção de doadores, baseados no risco de infecção por *Plasmodium*, foram estabelecidos em 1969 por uma Portaria (sem número) da extinta Comissão Nacional de Hemoterapia. Em 1988, com a publicação da Lei n° 7.649/1988, a malária foi incluída no rol de doenças que deveriam, obrigatoriamente, serem testadas na triagem laboratorial de doadores. Apesar disso, somente após a Resolução Mercosul n° 42/2000, é que o MS, por meio da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) n° 343/2002, incluiu nos regulamentos técnicos da hemoterapia a obrigatoriedade do teste para malária.

Outra alteração substancial instituída pela RDC Anvisa n° 343/2002 foi a que estabeleceu que os SH localizados nas áreas endêmicas deveriam utilizar as faixas de risco do IPA como critério para exclusão de candidatos à doação provenientes de áreas de alto risco (IPA > 49,9 lâminas positivas por 1.000 habitantes).

Desde então o IPA vem sendo utilizado como parâmetro para aferir o risco de se ter um doador infectado pelo *Plasmodium* no momento da doação. Como relatado anteriormente, o IPA é um indicador classicamente utilizado pelo PNCM e seus usos são apontados na ficha de qualificação de indicadores da Rede Interagencial de Informações para a Saúde (RIPSA) da seguinte forma:

- a) analisar variações populacionais, geográficas e temporais na distribuição dos casos de malária, como parte do conjunto de ações de vigilância epidemiológica e ambiental da doença;
- b) contribuir para a avaliação e orientação das medidas de controle vetorial de anofelinos;
- c) subsidiar

processos de planejamento, gestão e avaliação de políticas e ações de saúde direcionadas ao controle de doenças de transmissão vetorial. Não foi, portanto, estabelecido com a finalidade de selecionar doadores segundo risco de transmissão de malária aos receptores de hemocomponentes.

Os critérios estabelecidos atualmente na regulação para impedir a doação de indivíduos com risco de infecção por *Plasmodium* são diferentes para a área endêmica, isto é, Região Amazônica brasileira, e para a área não endêmica.

Nas áreas indenes, a triagem laboratorial não é obrigatória, mas a triagem clínica e epidemiológica possui exigências mais sensíveis, tornando inapto por 12 meses o candidato que tenha se deslocado ou que seja proveniente da área endêmica.

Na área endêmica, segundo a Portaria MS 2.712/2013 (Ministério da Saúde, 2013b), são impedidos de doar os indivíduos que i) tiveram malária nos últimos 12 meses; ii) tiveram suspeita de malária nos últimos 30 dias; iii) residem em municípios com alto risco de transmissão, isto é, com IPA>49,9 lâminas positivas por 1.000 habitantes (IPA>49,9); iv) deslocaram-se para municípios com IPA>49,9 nos últimos 30 dias e v) tiveram malária por *Plasmodium malariae* (válido também para áreas indenes). Além disso, todos os doadores devem ser submetidos à triagem laboratorial com testes laboratoriais de detecção direta do *Plasmodium* ou seus antígenos.

Dessa forma, assume-se que a população brasileira que vive nas áreas endêmicas para malária está submetida a um risco maior de aquisição de MTT em comparação com a população fora dela.

Vale destacar que a Portaria MS 2.712/2013 exige que para todas as doenças transmissíveis pelo sangue sejam realizados testes laboratoriais de alta sensibilidade. Contudo, esta exigência não é apresentada para triagem da malária e sabe-se que a maioria dos SH no Brasil utiliza a gota espessa como teste de triagem de doadores. Como já relatado, a gota espessa apresenta limitações de sensibilidade para detecção de *Plasmodium* em condições de baixa parasitemia, como os indivíduos em período de incubação e os PAP.

Portanto, alternativas a gota espessa, como os NAT, devem ser avaliadas para a utilização na triagem laboratorial dos doadores.

3. JUSTIFICATIVA

A malária é endêmica na Região Amazônica brasileira com cerca de 300 mil casos registrados anualmente. Apesar do grande número de casos, a letalidade, em 2 óbitos a cada 10.000 casos, é muito baixa em comparação com outros países endêmicos, o que demonstra, em parte, o sucesso das estratégias de diagnóstico e tratamento da doença no Brasil (Ministério da Saúde, 2013a).

Por outro lado, o Brasil notificou apenas quatro casos de MTT nos últimos 10 anos. Todos esses quatro casos ocorreram na Região Amazônica, todos evoluíram para óbito e foram causados por *P. vivax*, apontando para a gravidade dos casos de MTT. Esse pequeno número de casos de MTT notificados é, provavelmente, resultado de subnotificação. Isso porque se estima que a prevalência de infecção por *Plasmodium* em doadores aptos, nas áreas endêmicas brasileiras, utilizando NAT para detecção do *Plasmodium*, esteja entre 0,3% a 3% (Torres *et al.*, 2006) (Fujikaha *et al.*, 2007) (Batista-dos-Santos *et al.*, 2012).

A triagem de doadores de sangue para a malária é um desafio na hemoterapia. Os candidatos à doação que estão infectados pelo *Plasmodium*, regra geral, se apresentam assintomáticos nos SH. Eles são de dois tipos: PAP e indivíduos infectados que ainda estão no período de incubação da doença. Indivíduos nessas duas condições apresentam baixa parasitemia, o que dificulta a correta identificação do parasito no sangue. Essa condição amplia o risco de liberação de resultados laboratoriais falsamente negativos, especialmente se utilizados testes tradicionais de detecção direta do parasito como a gota espessa, o teste QBC® e os imunocromatográficos.

Nas áreas endêmicas, a exclusão de candidatos à doação pela triagem clínica e epidemiológica depende da avaliação de exposições do candidato aos fatores de risco para a malária. A depender da localização do SH, é possível

que a exclusão de todos os candidatos à doação que foram expostos aos critérios de exclusão previstos na legislação cause desabastecimento de sangue na localidade. Dessa forma, é relevante estudar a prevalência da malária e dos seus fatores de risco em candidatos a doação de sangue na Região Amazônica brasileira.

Historicamente, desde a publicação da Portaria MS nº 721/GM/1989 (Ministério da Saúde, 1989), as normas técnicas têm orientado os SH a seguirem os mesmos requisitos para prevenir a malária transfusional que são: a) todos os hemocentros devem incluir na triagem clínica do doador a avaliação de risco de o doador estar infectado com o *Plasmodium*; b) esta avaliação deve incluir a análise dos deslocamentos para áreas endêmicas, histórico de infecções anteriores e sinais e sintomas. Contudo, os testes laboratoriais para a malária só se tornaram obrigatórios nas áreas endêmicas após a publicação da RDC Anvisa nº 343/2002 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2002). O teste recomendado é o parasitológico. Esse exame apresenta claras dificuldades operacionais no ambiente dos SH, a saber: alto percentual de resultados falsamente negativos em condições de baixa parasitemia, dificuldade de manter profissional capacitado pela ausência de visualização de lâminas positivas e o longo tempo de leitura da lâmina que é recomendado para se concluir por um resultado negativo (200 a 500 campos). O uso de NAT em substituição à gota espessa pode suprir estas deficiências e deve ser avaliado. OMS estuda exigir a realização, a partir de 2014, de NAT para detecção de infecções pelo Vírus da Hepatite C e pelo Vírus da Imunodeficiência Humana em todas as doações. Portanto, a inclusão do NAT na rotina dos SH brasileiros para detecção do *Plasmodium* sp é uma possibilidade que deve ser avaliada. Além do potencial para aumentar a segurança transfusional, pode-se contribuir para a caracterização clínica e epidemiológica dos PAP. Porém, o custo elevado para sua execução é uma limitação. Uma das estratégias possíveis para a redução do custo do NAT é a utilização de *pool* de amostras sanguíneas.

Atualmente, há duas regulamentações vigentes que trazem os critérios de seleção de doadores que devem ser seguidos pelos SH brasileiros, a RDC Anvisa nº 57 de 2010 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010) e a Portaria MS nº 2.712/2013 (Ministério da Saúde, 2013b). No entanto, a adesão dos SH a essas normas merece estudo.

Nesse contexto de grande desafio para a prevenção de casos de MTT na Região Amazônica brasileira, e de importantes lacunas de conhecimento, buscou-se realizar um estudo para: avaliar a sensibilidade de um NAT para detecção de *Plasmodium* em *pool* de amostras de sangue total; estimar a prevalência de infecção por *Plasmodium* sp e dos fatores de risco para malária entre candidatos à doação de sangue da Região Amazônica brasileira; realizar uma avaliação normativa de SH localizados na região amazônica com enfoque na prevenção da MTT.

Com o conjunto dos resultados, pretende-se apresentar uma avaliação do risco MTT na área endêmica brasileira e fornecer elementos aos tomadores de decisão para o aperfeiçoamento da regulação sanitária e das políticas na área de segurança de sangue e componentes com enfoque na malária.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o risco de transmissão de malária transfusional nos receptores de sangue e componentes produzidos por SH localizados na Região Amazônica brasileira a fim de propor medidas para reduzir esse risco

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar a sensibilidade analítica de um protocolo de *nested PCR* para detecção de *Plasmodium* spp em *pool* de amostras de sangue total;
2. Estimar a prevalência de infecção por *Plasmodium* spp entre candidatos à doação de sangue de SH localizados na Região Amazônica brasileira, por meio de testes de detecção de ácidos nucleicos;
3. Estimar a prevalência de fatores de risco para infecção por *Plasmodium* spp entre candidatos à doação de sangue de SH localizados na Região Amazônica brasileira;
4. Estimar a acurácia da triagem clínica e laboratorial para a malária dos SH para os candidatos à doação de sangue, tendo como padrão-ouro a *nested-PCR* em *pool* de amostras;
5. Realizar avaliação normativa em SH localizados na Região Amazônica brasileira, quanto ao cumprimento dos requisitos técnico-sanitários da RDC Anvisa n° 153/2004, vigente à época do estudo, com enfoque na prevenção da MTT.

5. MÉTODOS

5.1. Determinação da sensibilidade da *nested PCR* em *pool* de amostras para detecção do *Plasmodium spp*

5.1.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo de validação do tipo *one-stage* para estimar a sensibilidade da *nested-PCR* para detecção de ácido nucleico do *Plasmodium*. O estudo foi realizado no contexto de um estudo de validação para um NAT de amostras em *pool*, uma ferramenta potencialmente útil para triagem de doadores de sangue para malária em SH de regiões endêmicas.

Este estudo utilizou amostras de 20 pacientes com infecção de malária para *P. vivax* e *P. falciparum*, confirmadas pela gota espessa, e uma amostra de cultura *in vitro* de *P. falciparum*. As amostras negativas foram obtidas de 10 indivíduos que não eram de uma área endêmica de malária.

5.1.2. Preparação do *pool* de amostras

As concentrações de parasitos foram determinadas pela gota espessa em todos os pacientes com malária. Em seguida, diluíram-se estas amostras positivas usando sangue total de amostras negativas, até que concentrações de 1,0 parasito/ μ L (em diferentes volumes) fossem alcançadas. Este limite inferior foi baseado na suposição de que doadores com parasitemias de 1,0 parasito/ μ L seriam facilmente diagnosticados como negativos pela rotina de triagem com a gota espessa nos SH. Este primeiro passo representa as baixas parasitemias de doadores infectados que foram considerados aptos após passarem pelos procedimentos de triagem clínica e epidemiológica.

No passo seguinte, representando diluições de *pool* de amostras de sangue, foram adicionados diferentes volumes de amostras de sangue total negativo para malária até atingir um volume de 3,0 mL – alcançando três diferentes concentrações finais: 0,33, 0,25 e 0,20 parasito/ μ L. As amostras negativas não foram agrupadas em *pool* antes de serem adicionadas nas amostras positivas. As diluições foram interrompidas até que a sensibilidade atingisse valores menores que 100%.

5.1.3. Microscopia

As lâminas para análise da gota espessa foram fixadas em metanol e coradas com Giemsa a 3% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Concentrações de parasitos foram determinadas por um microscopista experiente do Hospital Julio Müller (um hospital de ensino filiado à Universidade Federal do Mato Grosso) que examinou 200 campos (Ministério da Saúde, 2009).

5.1.4. Execução da *nested PCR*

i. Extração de DNA. Um volume de 3,0 mL de sangue total foi utilizado para a extração do DNA para a PCR. A extração foi realizada utilizando o kit de extração Wizard® Genomic (Kit de Purificação de DNA) da Promega®, conforme instruções do fabricante. Após o passo de reidratação, o DNA foi usado imediatamente para amplificação ou foi armazenado a 2-8°C até sua utilização.

ii. Amplificação. Foi utilizado o método da *nested PCR* previamente descrito (Snounou *et al.*, 1993), com uma modificação (utilização de um kit comercial de mistura de reagentes em substituição ao protocolo original). Esta estratégia tem como alvo sequências para a amplificação dos genes das subunidades ribossomais 18S das três espécies de *Plasmodium* prevalentes na região amazônica, o *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Para amplificação do gênero foram usados os *primers* rPLU5 e rPLU6. Para a amplificação específica

de espécie se usou os *primers* rVIV1 e rVIV2 para *P. vivax*, rFAL1 e rFAL2 para *P. falciparum* e rMAL1 e rMAL2 para *P. malariae*. Para reduzir o risco de contaminação e de erros de pipetagem durante a preparação da mistura de reagentes (mix), utilizou-se o PCR Master Mix da Promega®. O volume final da reação foi de 25,0 µL incluindo: 20,0 µL de PCR Master Mix (0,6 unidades de Taq DNA polimerase, 400 µM de cada DNTP, 3,0 mM de MgCl₂ e tampão Tris pH 8,5), 1,0 µL de cada um dos *primers* a 6,25 µM, e 3,0 µL da amostra de DNA. Todos os *primers* foram adquiridos da IDT® (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, EUA). As amostras foram amplificadas utilizando um termociclador (Mastercycler® Pro Eppendorf Scientific Inc., Westbury, NY, EUA). Foram usados 25 e 30 ciclos de amplificação para a reação de amplificação do gênero e da espécie, respectivamente.

iii. Detecção. Para visualizar os produtos da *nested PCR* foi utilizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio. A visualização da eletroforese foi realizada sob luz ultravioleta, sendo utilizado um sistema de documentação fotográfica. Em todas as corridas eletroforéticas foi utilizado um marcador de 1 kb (Invitrogen, Inc., EUA), para estimar o peso molecular dos fragmentos de DNA amplificados.

Um controle negativo e um controle positivo de sangue para *P. falciparum* e *P. vivax* foram incluídos ao lado de cada execução de extração de DNA, amplificação e detecção.

Como controle da extração, todas as amostras foram testadas para amplificação por reação de cadeia da polimerase (PCR) usando iniciadores dirigidos contra uma sequência do exon 7 do gene ABO, de grupo sanguíneo.

5.1.5. Análise dos dados

O padrão-ouro para este estudo foi o uso de amostras negativas adicionadas com amostras sabidamente positivas (embora em diluições muito baixas). A sensibilidade foi determinada para cada estrato de concentração de parasito entre as amostras em *pool*. A sensibilidade foi estratificada por diluição

(concentração de parasitos) para cada *pool*. Os *pools* com um resultado positivo na *nested PCR* foram considerados casos verdadeiro-positivos. Os intervalos de confiança a 95% (IC95%) binomial foram calculados para cada estrato.

5.2. Estimativa da prevalência de infecção por *Plasmodium spp* e de fatores de risco para malária

5.2.1. População de estudo

A população fonte do estudo foi composta por candidatos à doação de sangue que se apresentaram em quatro SH de três diferentes estados da Região Amazônica brasileira.

O período de coleta foi de novembro de 2009 a setembro de 2010, em um intervalo de tempo que variou em cada SH. No período de coleta, candidatos à doação que se apresentaram para doação foram abordados e aqueles que expressaram concordância em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram incluídos na amostra. Não houve critério de exclusão de participantes desde que o sujeito da pesquisa tenha concordado e assinado o TCLE.

Para o cálculo do tamanho da amostra utilizou-se a alocação estratificada proporcional com parâmetros fornecidos pelos próprios SH. Os estratos foram os quatro SH e para cada um foi estimado o tamanho da amostra segundo os seguintes parâmetros: número de triagens clínicas de candidatos à doação realizadas mensalmente, número de doadores aptos à doação e número de doadores inaptos à doação por qualquer motivo. Estimou-se uma prevalência de 3% de doadores aptos positivos para *Plasmodium sp*, utilizando a *nested PCR* como método de detecção de ácido nucleico (Fujikaha *et al.*, 2007). Para os candidatos à doação inaptos, utilizou-se 5% de prevalência. Baseado nesses parâmetros, para um nível de confiança de 95% e erro relativo aceito de 20% (ou erro absoluto de 0,6%) para a amostra de doadores aptos e de

25% (ou erro absoluto de 1,25%) em torno da prevalência esperada, o tamanho amostral mínimo requerido foi 2.695 candidatos à doação, distribuídos conforme demonstrado o quadro 1 (ver Seção Resultados, Artigo 2).

Para compensar desistências, perdas ou insuficiência de material biológico adequado, a esse número foi acrescido 10%, distribuídos para cada um dos estratos, resultando em uma amostra de 2.965 candidatos a doação.

5.2.2. Execução da *nested PCR*

Foram coletados aproximadamente 3,0 mL de sangue total em tubos com anticoagulante (EDTA) de cada participante. As amostras foram mantidas refrigeradas a 4 °C até a formação dos *pools*. Os testes da *nested PCR* foram executados em *pools* de até 2,5 mL de sangue total composto por alíquotas de 0,5 mL de até cinco diferentes amostras individuais. A sensibilidade da *nested PCR* para estas condições foi verificada previamente (Freitas *et al.*, 2014). Após a formação dos *pools*, as amostras individuais e os *pools* foram congelados a -20 °C até o processamento.

A extração do DNA, amplificação e detecção foram realizadas conforme descrito no item 5.1.4.

5.2.3. Coleta, processamento e análise dos dados

As variáveis de interesse para o estudo foram coletadas por questionário epidemiológico padronizado e incluíram as variáveis demográficas e fatores de risco para malária, a saber: exposição frequente à área rural (moradia, trabalho ou estudo), exposição em áreas de risco nos últimos 30 dias (áreas rurais, silvestres e garimpos), exposição em municípios com IPA > 49,9 [procedentes (moradia, trabalho, estudo) ou deslocamentos nos últimos 30 dias] e histórico de malária (suspeitas e confirmadas). O IPA do município foi obtido do SIVEP-Malária. Foram considerados indivíduos “suspeitos de malária nos últimos 30

dias” os que responderam positivamente se tinham se submetido ao teste da gota espessa nos últimos 30 dias.

Para os candidatos à doação aptos na triagem clínica e epidemiológica dos SH coletou-se ainda o resultado da triagem laboratorial para malária. Foram considerados candidatos à doação aptos na triagem clínica e epidemiológica os doadores que efetuaram a doação nos SH. Para os candidatos à doação inaptos, coletou-se o motivo da inaptidão.

As prevalências de malária e dos fatores de risco, com seus respectivos IC95%, foram estimados com base nos resultados da *nested PCR* e das respostas ao questionário padronizado, respectivamente. Os parâmetros de validade da triagem clínica e epidemiológica e da triagem laboratorial dos SH (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo) foram calculados utilizando os resultados da *nested PCR* como padrão-ouro.

5.3. Avaliação normativa dos serviços de hemoterapia com enfoque na prevenção da transmissão da malária por transfusão

O presente estudo é uma pesquisa avaliativa normativa, com enfoque na avaliação para a gestão (Novaes, 2000). Avaliar é fazer um julgamento de valor sobre uma intervenção ou sobre seus componentes para ajudar na tomada de decisões. Este julgamento pode ser baseado na aplicação de critérios e de normas e, neste caso, é chamada de avaliação normativa, definida como a atividade de fazer um julgamento, comparando a organização (estrutura), os procedimentos ou métodos desenvolvidos (processo), os recursos empregados e os resultados obtidos, com os requisitos e critérios estabelecidos em normas (Contandriopoulos *et al.*, 1997). Trata-se de uma atividade científica que requer para sua execução determinado rigor metodológico (Uchimura & Bosi, 2002).

Esta pesquisa utilizou avaliadores externos e o contexto da avaliação foi o natural (sem intervenções) (Contandriopoulos *et al.*, 1997). O juízo formulado se baseou na RDC Anvisa nº 153/2004(RDC 153/2004) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004), vigente à época, para o tema prevenção da MTT.

Os componentes trabalhados na avaliação foram estrutura e processo (Donabedian, 1988).

A coleta de dados ocorreu de Janeiro de 2009 a Junho de 2011. Foram avaliados todos os nove hemocentros coordenadores da Região Amazônica brasileira e um núcleo de hemoterapia. Para a coleta de dados, utilizou-se roteiro padronizado semiestruturado, preenchido por meio de entrevista com o responsável técnico do SH e/ou responsável pelo setores/atividades avaliados (educação do doador, triagem clínica, triagem sorológica, hemovigilância). O roteiro foi aplicado por um único pesquisador, experiente na aplicação de roteiros de inspeção e em entrevista epidemiológica. Para complementar o roteiro, foram avaliados materiais educativos para os candidatos à doação e instruções escritas (procedimentos operacionais).

Os SH foram categorizados em adequado, parcialmente adequado ou inadequado (ver Seção Resultados, Artigo 3, quadro 1), conforme a pontuação obtida. Para a definição dos pesos de cada atividade e item, utilizou-se o conceito de risco potencial (Leite & Navarro, 2009), tido como a “possibilidade de ocorrência de um agravo à saúde, sem necessariamente descrever o agravo e sua probabilidade de ocorrência. É um conceito que expressa o juízo de valor sobre exposição em potencial a um possível risco”. Diferentemente do risco epidemiológico que pode ser medido e calculado, o risco potencial é construído, muitas vezes, da percepção acumulativa de especialistas sobre os erros ou falhas de determinado produto, processo e serviço ao longo da história (Leite & Navarro, 2009). Portanto, os critérios para pontuação foram baseados na avaliação dos autores sobre o risco potencial de ocorrência de casos de MTT pelo não cumprimento de cada item da norma. Foram considerados como críticos para a ocorrência de MTT as atividades da triagem clínica e da triagem laboratorial. Os detalhes da pontuação e de cada item avaliado estão apresentados no quadro 2 (ver Seção Resultados, Artigo 3). Destaca-se que, embora tais critérios estejam fundamentados na RDC 153/2004, o texto final de cada item avaliado evidencia o foco específico no controle de risco para MTT. Portanto, não se trata de uma descrição literal do texto da RDC 153/2004.

O modelo ideal com as melhores práticas para a máxima redução do risco de MTT, segundo a RDC 153/2004, é apresentado na figura 1 (ver Seção Resultados, Artigo 3). Neste modelo, as quatro atividades envolvidas na prevenção da MTT são apresentadas nos componentes estruturas, processos e resultados.

5.4. Aprovação por comitês de ética em pesquisa com seres humanos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller da Universidade Federal do Mato Grosso (Registro nº 640/09) e pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Registro nº 028/2009).

6. RESULTADOS

6.1. Artigo 1

Publicado no periódico *Transfusion and Apheresis Science*.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2014.01.016>

Título

Sensibilidade da *nested-PCR* para detecção de *Plasmodium* spp em *pool* de amostras de sangue total e sua utilidade na triagem de doadores de sangue em áreas endêmicas.

Autores

Daniel Roberto Coradi de Freitas (1,2)

Luciano Teixeira Gomes (3)

Cor Jesus F. Fontes (3)

Pedro Luiz Tauil (1)

Lorrin W. Pang (1)

Elisabeth Carmen Duarte (1)

Afiliações

1. Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, Brasil.

3. Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

Resumo

A malária transmitida pela transfusão é uma doença grave, com alta taxa de letalidade. A maioria dos serviços de hemoterapia (SH) brasileiros da Região Amazônica realiza a triagem laboratorial de doadores para a malária usando o exame microscópico da gota espessa (GE). Uma vez que baixas concentrações de parasitos são esperadas em doadores de sangue assintomáticos, um teste com sensibilidade elevada deve ser utilizado para a seleção do doador. Este estudo determinou a sensibilidade de um protocolo de *nested PCR* para a detecção de plasmódios em *pool* de amostras de sangue total. Foi realizado um estudo de validação do tipo *one stage* com 21 amostras positivas agregadas em *pool* com diferentes amostras negativas de dez voluntários até que três diferentes concentrações foram alcançadas (0,33, 0,25, 0,20 parasito/microlitro - p/microL). A *nested PCR* foi realizada como descrito por Snounou *et al.* (1993). As sensibilidades (e seus intervalos de confiança a 95%) foram determinadas para cada concentração final do parasito das amostras em *pool*. Para todos os *pools* com valores de parasitemia de 0,33 e 0,25 p/microL, a sensibilidade foi de 100% (IC95%: 86,3% a 100%). Um resultado negativo foi obtido em uma amostra com 0,20p/microL [sensibilidade=95,2% (IC95%: 76,2% a 99.9%)]. Comparada com a parasitemia que pode ser detectada pela GE nas condições ideais de preparo e leitura, este protocolo de *nested PCR* em *pool* de amostras de sangue total foi capaz de detectar 40 vezes mais parasitos por microlitro. A *nested PCR* em *pool* de amostras deve ser considerada como uma alternativa de alta sensibilidade à GE para a triagem de doadores em SH de regiões endêmicas. As autoridades locais precisam avaliar o custo:benefício deste método em comparação com outros métodos altamente sensíveis.

Palavras chave

Malária – segurança do sangue – triagem de doador – sensibilidade – *nested PCR*

Abstract

Transfusion-transmitted malaria is a severe disease with high fatality rate. Most Brazilian blood banks in the Amazon Region perform malaria screening using microscopic examination (thick smears). Since low parasite concentrations are expected in asymptomatic blood donors a high sensitivity test should be used for donor screening. This study determined the sensitivity of a nested-PCR for plasmodium detection in *pooled* samples. We performed a one-stage criterion validation study with 21 positive samples *pooled* with samples from ten negative volunteer until three different concentrations were reached (0.33; 0.25; 0.20 parasites/microliters-p/microL). Nested PCR was performed as described by Snounou et al. (1993). Sensitivities (and confidence intervals) were determined by stratum of final parasite concentration on the *pooled* samples. All samples with parasitemia values of 0.33 and 0.25 p/microL had 100% sensitivity (95% CI=86.3-100%]. One negative result was obtained from a sample with 0.20 p/microL sensitivity = 95.2% (95%CI=76.2-99.9). Compared to parasitemia detectable under ideal conditions of thick smear, this nested-PCR in *pooled* sample was able to detect 40 times more parasites per microliter. Nested-PCR in *pooled* samples should be considered as a high sensitive alternative to thick smear for donor screening in blood banks at endemic regions. Local authorities need to assess cost:benefit advantages of this method compared to alternatives.

Key words:

malaria – blood safety – donor screening – sensitivity – nested PCR

Introdução

No mundo, a cada ano ocorrem cerca de 230 milhões de casos de malária [1]. Na Amazônia brasileira há cerca de 300 mil episódios por ano. Apesar de rara em comparação com a infecção natural, a malária transmitida por transfusão (MTT) é uma doença grave, com uma alta taxa de letalidade [2,3]. No Brasil, de acordo com o Sistema Nacional de Hemovigilância, foram notificados quatro casos de MTT desde 2005, todos fatais e causados pelo *Plasmodium vivax*.

Três fatores importantes afetam a MTT: 1) a prevalência da malária em doadores de sangue 2) os critérios de seleção dos doadores por meio de questionários (sinais clínicos/ sintomas e exposições a fatores de risco) e 3) a triagem laboratorial. Na Amazônia brasileira, onde a malária é endêmica, o algoritmo para selecionar doadores de sangue exige a aplicação de questionário com perguntas sobre sinais, sintomas e história de exposição. Após o questionário, é obrigatória a aplicação de um teste laboratorial de detecção direta do parasito ou seus antígenos. Embora os procedimentos de triagem laboratorial com alta sensibilidade sejam desejáveis em bancos de sangue, a detecção da malária continua a ser uma tarefa desafiadora. Quase todos os bancos de sangue na região da Amazônia brasileira utilizam o exame microscópico de gota espessa para triagem da malária.

É sabido que o exame de gota espessa tem várias limitações quando aplicados a triagem dos doadores em SH: a) as baixas parasitemias em doadores assintomáticos (incubação, portadores assintomáticos) podem resultar em muito menor sensibilidade da gota espessa em relação ao teste de detecção do ácido nucleico (NAT) [4]; b) exames de gota espessa são muito dependentes da experiência do profissional que faz a preparação manual e leitura das lâminas e, muitas vezes, os resultados estão sujeitos a grandes variações; c) não há consenso de quantos campos na lâmina devem ser examinados para se determinar uma lâmina como “negativa”. O Manual de Diagnóstico

Laboratorial da Malária brasileiro recomenda que pelo menos 500 campos devam ser examinados para se determinar que uma lâmina seja negativa. Outros estudos recomendam o exame de 100 a 500 campos [5,6,7].

Os portadores assintomáticos de infecção por *Plasmodium* (PAP) têm baixas parasitemias [8,9] e são a fonte de infecção da maioria dos casos de MTT [10] [11]. No mundo todo, o uso do NAT para detectar os casos de malária com parasitemias submicroscópicas ou para PAP têm sido largamente utilizado para fins de pesquisa. O uso do NAT como um teste de triagem da malária em serviços de hemoterapia de áreas endêmicas deve ser avaliado como uma alternativa. Comparado à gota espessa, o NAT é conhecido por ter maior sensibilidade [4,12,13] e estar menos sujeito ao erro humano. Por outro lado, os custos são mais elevados do que os dos testes de triagem convencionais. A utilização de *pool* de amostras poderia reduzir esta dificuldade [14]. A triagem de doadores de sangue para a malária tem algumas questões-chave que devem ser abordadas tanto do ponto de vista prático como científico. Este trabalho começa a olhar para a o ponto de vista pratico de se formar *pools* de amostras de sangue para reduzir os custos dos NAT para malária.

Foi descrito anteriormente que a *nested PCR*, como descrita por Snounou et al. (1993) [15], é capaz de detectar parasitemias tão baixas quanto 20 a 1 parasitos/ μ L, dependendo dos protocolos de purificação do DNA e da amostra utilizada; sangue total [16], *pellets* de hemácias [17], ou gotas de sangue em papel filtro [18,19]. Este trabalho apresenta uma análise de sensibilidade da *nested PCR* previamente descrita [15], utilizando-se amostras de sangue total em *pool*, e se discute a utilidade e as limitações da aplicação desta técnica em serviços de hemoterapia de regiões endêmicas para malária para reduzir custos na triagem laboratorial e melhorar a segurança das transfusões de sangue.

Materiais e métodos

Tipo de estudo

Trata-se de um estudo de validação do tipo *one-stage* para estimar a sensibilidade da *nested-PCR* para detecção de ácido nucleico do *Plasmodium*. O estudo foi realizado no contexto de um estudo de validação para um NAT de amostras em *pool*, uma ferramenta potencialmente útil para triagem de doadores de sangue para malária em SH de regiões endêmicas.

Este estudo utilizou amostras de 20 pacientes com infecção de malária para *P. vivax* e *P. falciparum*, confirmadas pela gota espessa, e uma amostra de cultura *in vitro* de *P. falciparum*. As amostras negativas foram obtidas de 10 indivíduos residentes em Cuiabá, Mato Grosso. Apesar de a cidade de Cuiabá estar localizada na área endêmica, casos autóctones de malária não são registrados no município há mais de duas décadas.

Preparação do *pool* de amostras

As concentrações de parasitos foram determinadas pela gota espessa em todos os pacientes com malária. Em seguida, diluiu-se estas amostras positivas usando sangue total de amostras negativas, até que concentrações de 1,0 parasito/ μ L (em diferentes volumes) fossem alcançadas. Este limite inferior foi baseado na suposição de que doadores com parasitemias de 1,0 parasito/ μ L seriam facilmente diagnosticados como negativos pela rotina de triagem com a gota espessa nos serviços de hemoterapia. Este primeiro passo representa as baixas parasitemias de doadores infectados que foram considerados aptos após passarem pelos procedimentos de triagem clínica e epidemiológica.

No passo seguinte, representando diluições de *pool* de amostras de sangue, foram adicionados diferentes volumes de amostras de sangue total negativo para malária até atingir um volume de 3,0 mL – alcançando três diferentes concentrações finais: 0,33, 0,25 e 0,20 parasito/ μ L. As amostras negativas não foram agrupadas em *pool* antes de serem adicionadas nas amostras positivas. As diluições foram interrompidas até que a sensibilidade atingisse valores menores que 100%.

Microscopia

As lâminas para análise da gota espessa foram fixadas em metanol e coradas com Giemsa a 3% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Concentrações de parasitos foram determinadas por um microscopista experiente do Hospital Julio Müller (um hospital de ensino filiado à Universidade Federal do Mato Grosso) que examinou 200 campos.

Execução da *nested PCR*

i. Extração de DNA. Um volume de 3,0 mL de sangue total foi utilizado para a extração do DNA para a PCR. A extração foi realizada utilizando o kit de extração Wizard® Genomic (Kit de Purificação de DNA) da Promega®, conforme instruções do fabricante. Após o passo de reidratação, o DNA foi usado imediatamente para amplificação ou foi armazenado a 2-8°C até sua utilização.

ii. Amplificação. Foi utilizado o método da *nested PCR* previamente descrito por Snounou et al. (1993) [15], com uma modificação (utilização de um kit comercial de mistura de reagentes em substituição ao protocolo original). Esta estratégia tem como alvo sequencias para a amplificação dos genes das subunidades ribossomais 18S das três espécies de *Plasmodium* prevalentes na região amazônica, o *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Para amplificação do gênero foram usados os *primers* rPLU5 e rPLU6. Para a amplificação específica de espécie se usou os *primers* rVIV1 e rVIV2 para *P. vivax*, rFAL1 e rFAL2 para *P. falciparum* e rMAL1 e rMAL2 para *P. malariae*. Para reduzir o risco de contaminação e de erros de pipetagem durante a preparação da mistura de reagentes (mix), utilizou-se o PCR Master Mix da Promega®. O volume final da reação foi de 25,0 µL incluindo: 20,0 µL de PCR Master Mix (0,6 unidades de Taq DNA polimerase, 400 µM de cada DNTP, 3,0 mM de MgCl₂ e tampão Tris pH 8,5), 1,0 µL de cada um dos *primers* a 6,25 µM, e 3,0

μL da amostra de DNA. Todos os *primers* foram adquiridos da IDT® (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, EUA). As amostras foram amplificadas utilizando um termociclador (Mastercycler® Pro Eppendorf Scientific Inc., Westbury, NY, EUA). Foram usados 25 e 30 ciclos de amplificação para a reação de amplificação do gênero e da espécie, respectivamente.

iii. Detecção. Para visualizar os produtos da *nested PCR* foi utilizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio. A visualização da eletroforese foi realizada sob luz ultravioleta, sendo utilizado um sistema de documentação fotográfica. Em todas as corridas eletroforéticas foi utilizado um marcador de 1 kb (Invitrogen, Inc., EUA), para estimar o peso molecular dos fragmentos de DNA amplificados.

Um controle negativo e um controle positivo para *P. falciparum* e *P. vivax* foram incluídos ao lado de cada execução de extração de DNA, amplificação e detecção.

Análise dos dados

O padrão-ouro para este estudo foi o uso de amostras negativas adicionadas com amostras sabidamente positivas (embora em diluições muito baixas). A sensibilidade foi determinada para cada estrato de concentração de parasito entre as amostras em *pool*. A sensibilidade foi estratificada por diluição (concentração de parasitos) para cada *pool*. Os *pools* com um resultado positivo na *nested PCR* foram considerados casos verdadeiro-positivos. Os intervalos de confiança binomial a 95% (IC95%) foram calculados para cada estrato.

Aprovação por comitês de ética em pesquisa com seres humanos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller da Universidade Federal do Mato Grosso (Registro nº

640/09) e pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Registrar nº 028/2009).

Resultados

Foram utilizadas 21 amostras positivas com diferentes parasitemias iniciais, variando de 25 parasitos/ μL a 20.537 p/ μL . Estas amostras são oriundas de pacientes que contraíram malária naturalmente em 12 municípios diferentes da Região Amazônica brasileira. Em 18 amostras foram identificados o *P. vivax* e em três o *P. falciparum*, incluindo uma amostra da cultura *in vitro*. As amostras negativas foram obtidas de 10 indivíduos da cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

Cada uma das amostras positivas foi diluída com sangue total até alcançar 1,0 parasito/ μL . Então foi novamente diluída a 2:1, 3:1 e 4:1 (representando *pools* de três, quatro e cinco amostras), resultando na concentração final de parasito de 0,33 p/ μL , 0,25 p/ μL e 0,20 p/ μL , respectivamente. Portanto, foram testados 63 *pools*, sendo três *pools* para cada amostra positiva (três concentrações diferentes de parasitos). Todos os *pools* com parasitemias de 0,33 p/ μL e 0,25 p/ μL tiveram resultado positivo na *nested PCR*. Um resultado negativo foi obtido do *pool* com 0,20 p/ μL (*P. vivax*).

As sensibilidades da *nested PCR* calculadas para cada *pool* estão mostradas na Tabela 2. A sensibilidade foi de 100% (IC95%: 86,3% a 100%) para cada uma das diluições de 1:2 e 1:3. Um resultado com sensibilidade ligeiramente menor foi obtido nos *pools* com diluição 1:4 (sensibilidade = 95,2%; IC95%: 76,2% a 99,9%).

Tabela 1: Resultado da sensibilidade da *nested PCR* nos *pools* de amostras de sangue total usando três diluições (n=63) oriundas de 21 amostras positivas para *Plasmodium* spp.

<i>Pool</i>	p/μL	+/total	Sensibilidade (%)	IC95% ^a
1:2	0,33	21/21	100	86,3 – 100
1:3	0,25	21/21	100	86,3 – 100
1:4	0,20	20/21	95,2	76,2 – 99,9

a–Intervalo de confiança binomial a 95%

Discussão

O uso da tecnologia NAT para triagem dos doadores em serviços de hemoterapia para agentes infecciosos está se tornando mais comum com os avanços tecnológicos. Ainda assim, pouco se tem feito para estudar a aplicação prática dos NAT para a triagem de doadores de sangue para a malária em contextos reais, sendo o alto custo dos NAT um importante fator de dissuasão. A alta sensibilidade teórica do NAT sugere que o uso de *pool* de amostras pode ser uma maneira de se reduzir os custos, mantendo a validade do teste. A *nested PCR*, como descrita por Snounou *et al.* (1993) [15], tem mostrado alta sensibilidade durante investigações epidemiológicas quando amostras de sangue são obtidas em papel filtro [20].

No entanto, ao se pensar na triagem laboratorial de doadores de sangue utilizando PCR em *pool* de amostras de sangue total para os SH, devem ser consideradas quatro questões que podem afetar a sensibilidade. 1. Degradação de DNA alvo durante a coleta, armazenamento ou processamento de amostras; 2. Inibidores da PCR onipresentes e que são conhecidos em todos os indivíduos [hemoglobina (Hb), imunoglobulina G (IgG) e lactoferrina]; 3. Inibidores desconhecidos (presente em alguns indivíduos, mas não em

outros); 4. Diluição do DNA alvo (e dos inibidores). Este estudo analisa a todos, exceto a terceira questão.

Imitando um cenário de diluições com 1:3 e 1:4 para a triagem nos SH, nós mostramos que a diluição de uma amostra positiva de sangue total de um doador com amostras de sangue negativas de três doadores diferentes não afetam a sensibilidade esperada da *nested PCR* [21]. O nível de detecção alcançado em nosso experimento foi compatível com outros estudos [18,21,22]. No entanto, após o início deste estudo, Mahajan *et al.* (2012) [23] descreveram um método para purificação de DNA do *Plasmodium*, partindo de sangue total, que inclui a incubação com saponina, e obteve uma sensibilidade de 0,002 p/μL, que é cem vezes acima da sensibilidade observada neste estudo. Esta sensibilidade impressionante foi alcançada no contexto de *P. falciparum* cultivado que foi adicionado em amostras de sangue e testados com um conjunto diferente de *primers*. Em nosso protocolo a saponina não foi acrescentada, uma vez as instruções do kit de extração Promega não incluíam esta etapa. Mas, mesmo com a possibilidade de aumentar significativamente a sensibilidade com o método descrito por Mahajan *et al.* (o que implica em uma redução ainda maior dos custos pela adição de mais doadores nos *pools* e/ou detectar níveis ainda mais baixos de parasitemias que também podem causar MTT) estes métodos devem ser estudados em condições que mimetizem os serviços de hemoterapia, devido ao potencial problema de inibidores (ponto 3, acima).

O efeito inibitório de hemoglobina (Hb) e outros fatores inibitórios sobre a PCR limita o volume de sangue que pode ser utilizado no teste para parasitas intraeritrocitários como os plasmódios [24] e, conseqüentemente, o tamanho dos *pools*. Para os inibidores conhecidos, assumiu-se que todos os indivíduos incluídos no nosso estudo têm mais ou menos a mesma quantidade e qualidade destes tipos de inibidores. Pode haver outros inibidores da PCR não identificados no sangue total (tanto nas amostras positivas para malária como nas amostras negativas) que somente serão detectáveis pela triagem em um grande número de doadores. Nossa amostra de apenas 10 indivíduos

negativos foi muito pequena para garantir a presença de inibidores raros (baixa prevalência) [25]. Esta questão pode ser avaliada em um estudo futuro incorporando um número muito maior de amostras negativas. Em teoria, com modificações na PCR para aumentar ainda mais a sua sensibilidade, qualquer tentativa para aumentar o tamanho do *pool* para reduzir os custos poderia aumentar a probabilidade da presença destes tipos de inibidores raros, gerando testes com resultados falsamente negativos. Quando um estudo como este for realizado, talvez um controle positivo possa ser utilizado para detectar os resultados falsamente negativos, mas isto iria dobrar o custo do material a ser testado.

Também é necessário considerar os custos e benefícios para o uso de um menor volume de sangue em cada *pool* para reduzir o efeito dos inibidores. Isto porque o resultado final de uma PCR pode ser visto como uma "competição" entre o DNA alvo (geralmente em quantidade muito baixa) e os inibidores. Por um lado, a probabilidade de incluir uma hemácia infectada com *Plasmodium* tende a aumentar à medida que um maior volume de sangue é testado. Por outro, com base nos resultados obtidos por Mahajan et al. (2012) [23], é possível que o efeito limitador da PCR exercido pelos inibidores tenderá a diminuir se um volume menor de sangue for testado. Portanto, pode-se questionar se um menor volume de sangue em cada *pool* poderia aumentar a sensibilidade da PCR e superar a limitação da baixa parasitemia.

Em condições ideais, os exames de gota espessa são capazes de detectar entre 10 a 50 parasitos/ μ L [26,27]. Na prática, só se pode detectar parasitos com concentrações 10 vezes maior (100 a 500 p/ μ L) [28,29]. Além disso, nas regiões onde as lâminas não são lidas rotineiramente (malária importada), a falta de habilidade dos microscopistas tem sido um grande problema [7,12,22]. Este mesmo argumento pode ser aplicado aos microscopistas que fazem a triagem de doadores de sangue nos serviços de hemoterapia. Eles verão muito poucas lâminas positivas porque a triagem clínica e epidemiológica exclui todos os casos sintomáticos ou com alto risco de infecção, exceto para aqueles com parasitemias quase indetectáveis pela gota espessa.

Em nosso estudo, a *nested PCR* em *pool* de quatro amostras, utilizando sangue total, foi capaz de detectar 0,25 p/μL com 100% de sensibilidade (diluição de 1:3). Esta parasitemia é 40 vezes menor que as parasitemias normalmente detectadas nas condições ideais para o teste de gota espessa ou 400 vezes menor que as parasitemias detectadas nas condições de campo. Vale ressaltar ainda que este aumento da sensibilidade está sob a condição de amostras em *pool*, que não apenas reflete fatores relacionados à diluição, como também da maior concentração relativa dos inibidores conhecidos que estão presentes nas amostras de sangue total (isto é, se as amostras fossem diluídas com outras substâncias com soro fisiológico, tampões ou mesmo soro humano, para se alcançar o volume final, os inibidores estariam presentes em menores concentrações). Uma vez que o uso continuado de gota espessa para a triagem de doadores nos SH tem um alto risco de ocorrência de resultados falsamente negativos, alguns autores têm discutido a importância do uso do NAT para compreender melhor a epidemiologia da malária e sua relação com a MTT [17,30,31]. Fujikaha *et al.* (2007) [20], utilizando *nested PCR*, encontrou uma prevalência de até 3% em doadores de sangue da Região Amazônica. Outro estudo utilizando a técnica da PCR em tempo real encontrou uma prevalência de 1,3% de infecções por *P. vivax* em doadores do Estado do Pará [33]. Estes autores concluíram que um método mais sensível de diagnóstico da malária é necessário nos SH de regiões endêmicas. No entanto, o alto custo de NAT comparado à gota espessa é considerado um obstáculo à sua utilização. É economicamente atraente considerar a realização de apenas o primeiro passo da *nested PCR*, ou seja, a amplificação dos genes gênero-específico. Porém, estudos já demonstraram a pouca sensibilidade de uma PCR simples, utilizando os conjuntos de primers rPLU 1-rPLU 5; rPLU 3 rPLU 4; rPLU 5 rPLU 6, comparada à *nested PCR*. [15,18].

Sob as limitações do nosso estudo (pequeno número de indivíduos negativos usados para formar os *pools*) a *nested PCR* mostrou ser uma boa alternativa laboratorial para a triagem em SH em comparação com o exame padrão de gota espessa. Como a sensibilidade para se detectar o DNA alvo em diluições

ainda maiores foi ampliada [23], permitindo um maior número amostras no *pool*, um estudo com um número grande de doadores de sangue precisa ser executado para saber se há indivíduos portadores de inibidores não conhecidos da PCR, e em caso afirmativo, em concentrações altas o suficiente para gerar resultados falsamente negativos no *pool* de amostras. Além disso, seria necessário realizar um estudo de custo-efetividade comparando os algoritmos já utilizados para a triagem da malária com a *nested PCR*.

No Brasil, as diretrizes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e do Ministério da Saúde obrigam que os SH das regiões endêmicas a executarem a triagem laboratorial de doadores para malária. Os regulamentos exigem que os testes devam ter alta sensibilidade e que o NAT pode ser utilizado para amostras individuais ou em *pool*. No entanto, na prática, os serviços de hemoterapia brasileiros baseiam a sua triagem da malária no questionário e nos exames de gota espessa. Nosso estudo mostra que a *nested PCR* é um teste promissor para uso em serviços de hemoterapia na triagem para malária, e que pode ser mais barato, por meio de protocolos usando *pool* de amostras, tornando-se custo-efetivo em comparação com a gota espessa.

Este estudo tem algumas limitações. As amostras testadas não são totalmente independentes. Apesar de cada *pool* (de um estrato) ter uma fonte positiva diferente, os indivíduos negativos vêm de um conjunto menor e são repetidos ao longo de todas as amostras positivas. Isto pode ter diminuído artificialmente a variância dos dados e os IC95% podem ter sido subestimados. Além disso, os resultados dos testes não foram lidos cegamente. No entanto, ao contrário de leitura das lâminas na gota espessa, este é um problema menor para a *nested PCR*, uma vez que os resultados da técnica são muito objetivos/automatizados, com pouca influência dos observadores sobre o resultado. Nós não incluímos *P. malariae* em nossas amostras uma vez que estes são parasitos raramente encontrados no Brasil [34].

Conclusão

Nested PCR em *pool* de amostras é uma alternativa promissora em relação à gota espessa para a triagem para a malária de doadores de sangue em SH de regiões endêmicas. Os gestores dos SH e as autoridades reguladoras devem considerar o nível de sensibilidade de detecção do teste, a prevalência da doença, número de amostras a serem testadas em cada *pool* e a concentração esperada de parasitos em cada *pool* para garantir um risco mínimo de MTT. Finalmente, o custo-efetividade, específico para cada área endêmica, deve determinar as vantagens relativas entre os diferentes procedimentos laboratoriais de triagem de doadores para a malária.

Agradecimento

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do governo brasileiro pelo apoio financeiro.

Referências

1. WHO: World malaria report: 2010. WHO 2010: p. 204.
2. Garraud O, Relave J, Flori P, Perraut R. Post-transfusion malaria: is the risk irreconcilable with biological silence? *Transfus Clin Biol* 2004; 11:87-94.
3. Mungai M, Tegtmeier G, Chamberland M, Parise M: Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999. *N Engl J Med* 2001; 344:1973-1978.
4. Alves F, Durlacher R, Menezes M, Krieger H, Silva L, Camargo E: High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66:641-648.
5. Steenkeste N, Incardona S, Chy S, Duval L, Ekala MT, Lim P, Hewitt S, Sochantha T, Socheat D, Rogier C, et al: Towards high-throughput molecular detection of *Plasmodium*: new approaches and molecular markers. *Malar J* 2009; 8:86.

6. Stauffer WM, Cartwright CP, Olson DA, Juni BA, Taylor CM, Bowers SH, Hanson KL, Rosenblatt JE, Boulware DR: Diagnostic performance of rapid diagnostic tests versus blood smears for malaria in US clinical practice. *Clin Infect Dis* 2009; 49:908-913.
7. Nkrumah B, Agyekum A, Acquah SE, May J, Tannich E, Brattig N, Nguah SB, von Thien H, Adu-Sarkodie Y, Huenger F: Comparison of the novel Partec rapid malaria test to the conventional Giemsa stain and the gold standard real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2010; 48:2925-2928.
8. Camargo EP, Alves F, Pereira da Silva LH: Symptomless *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians. *Lancet* 1999; 353:1415-1416.
9. Oner YA, Okutan SE, Artinyan E, Kocazeybek B: Malaria problem in Afghanistan: malaria scanning results of the Turkish medical aid group after the war. *Transfus Apher Sci* 2005; 32:133-137.
10. Kitchen AD, Barbara JA, Hewitt PE: Documented cases of post-transfusion malaria occurring in England: a review in relation to current and proposed donor-selection guidelines. *Vox Sang* 2005; 89:77-80.
11. Slinger R, Giulivi A, Bodie-Collins M, Hindieh F, John RS, Sher G, Goldman M, Ricketts M, Kain KC: Transfusion-transmitted malaria in Canada. *CMAJ* 2001; 164:377-379.
12. Rosanas-Urgell A, Mueller D, Betuela I, Barnadas C, Iga J, Zimmerman P, del Portillo H, Siba P, Mueller I, Felger I: Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. *Malar J* 2010; 9:361.
13. Rantala A, Taylor S, Trottman P, Luntamo M, Mbewe B, Maleta K, Kulmala T, Ashorn P, Meshnick S: Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malar J* 2010; 9:269.
14. Taylor S, Juliano J, Trottman P, Griffin J, Landis S, Kitsa P, Tshetu A, Meshnick S: High-throughput *pooling* and real-time PCR-based strategy for malaria detection. *J Clin Microbiol* 2010; 48:512-519.
15. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN: High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61:315-320.
16. Andrade BB, Reis-Filho A, Barros AM, Souza-Neto SM, Nogueira LL, Fukutani KF, Camargo EP, Camargo LMA, Barral A, Duarte A et al. Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. *Malar J* 2010; 9:117.

17. Gama BE, Silva-Pires FES, Lopes MNKR, Cardoso MAB, Britto C, Torres KL, Lima LM, Souza JM, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol* 2007; 116:427–432.
17. Proux S, Suwanarusk R, Barends M, Zwang J, Price RN, Leimanis M, Kiricharoen L, Laochan N, Russell B, Nosten F, Snounou G: Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. *Malar J* 2011; 10:323.
18. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman, HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:687–692.
19. Fuehrer HP, Fally MA, Habler VE, Starzengruber P, Swoboda P, Noedl H. Novel Nested Direct PCR Technique for Malaria Diagnosis Using Filter Paper Samples. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1628–1630.
20. Hsiang MS, Lin M, Dokomajilar C, Kemere J, Pilcher CD, Dorsey G, Greenhouse B. PCR-Based *pooling* of dried blood spots for detection of malaria parasites: optimization and application to a cohort of Ugandan children. *J Clin Microbiol* 2010; 48:3539–3543.
21. Hwang J, Jaroensuk J, Leimanis ML, Russell B, McGready R, Day N, Snounou G, Nosten F, Imwong M. Long-term storage limits PCR-based analyses of malaria parasites in archival dried blood spots. *Malar J* 2012; 11:339.
22. Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, Gyorkos TW, MacLean JD, Ward BJ. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2694–2700.
23. Mahajan B, Zheng H, Pham PT, Sedegah MY, Majam VF, Akolkar N, Rios M, Ankrah I, Madjitey P, Amoah G *et al.* Polymerase chain reaction–based tests for pan-species and species-specific detection of human *Plasmodium* parasites. *Transfusion* 2012; 52:1949-1956.
24. Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001; 39:485–493.
25. Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, Barnes WM. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Research* 2009; 37:5.
26. Suárez-Mutis MC, Coura JR. Evaluation of the thick smear in a field condition in a malaria endemic area in the Middle Region of Rio Negro, Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:495-497.
27. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:66–78.

28. Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst, DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *Clin Pathol* 1994; 47:740-742.
29. Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, Druilhe P, Laxminarayan R, Binka F, Kilama WL, Ford N, White NJ. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:564-573.
30. Shehata N, Kohli M, Detsky A: The cost-effectiveness of screening blood donors for malaria by PCR. *Transfusion* 2004, 44:217-228.
31. Ali MS, Yousif AG, Mustafa MS, Ibrahim MH: Evaluation of malaria parasite screening procedures among Sudanese blood donors. *Clin Lab Sci* 2005, 18:69-73.
32. Fugikaha E, Fornazari PA, Penhalbel RSR, Lorenzetti A, Maroso RD, Amoras JT, Saraiva AS, Silva RU, Bonini-Domingos CR, Mattos LC *et al.* Molecular screening of *Plasmodium* sp.asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2007; 49:1-4.
33. Batista-Dos-Santos S, Raiol M, Santos S, Cunha MG, Ribeiro-Dos-Santos A: Real-time PCR diagnosis of *Plasmodium vivax* among blood donors. *Malar J* 2012, 11:345.
34. Brasil. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. *Boletim Epidemiológico* 2013:44(1). Disponível em http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Abr/12/boletim_1_de_2013_malaria.pdf. Acessado em 28/11/2013.

6.2. Artigo 2

Título

Prevalência de infecção por *Plasmodium* spp e de fatores de risco para malária em candidatos à doação de sangue da Amazônia Brasileira.

Autores

Daniel Roberto Coradi de Freitas (1,2)

Elisabeth Carmen Duarte (1)

Cor Jesus Fernandes Fontes (3)

Afiliações

1. Núcleo de Medicina Tropical. Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, Brasil.

3. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

Resumo

Objetivo: estimar a prevalência de infecção por *Plasmodium* e de seus fatores de risco em candidatos à doação de sangue da Região Amazônica Brasileira (RAB). Analisou-se também a validade da triagem clínica e epidemiológica (TCE) e da triagem laboratorial (TL) de quatro serviços de hemoterapia (SH) selecionados na RAB.

Métodos: utilizou-se a *nested PCR* para malária em *pool* de amostras para calcular a prevalência de infecção por *Plasmodium* e os parâmetros da validação das triagens. Para estimar a prevalência dos fatores de risco os candidatos à doação foram entrevistados com base em um questionário epidemiológico padronizado.

Resultados: foram avaliados 2992 indivíduos. Os fatores de risco mais prevalentes foram: “morar, trabalhar ou estudar em município com Índice Parasitário Anual >49,0” (39,2%); “ter visitado áreas de risco para malária nos últimos 30 dias” (22,6%); “morar, trabalhar ou estudar na zona rural” (3,9%). A prevalência geral de infecção por *Plasmodium* foi de 0,07%, sendo de 0,17% entre os candidatos inaptos à doação na TCE dos SH e 0,04% entre os aptos. A sensibilidade da TCE foi de 50% e da TL de 0%.

Conclusão: a prevalência dos fatores de risco para malária é alta entre os candidatos a doação, o que dificulta a adoção de critérios específicos na TCE para a seleção de candidatos à doação. Por outro lado, a TL realizada com o teste da gota espessa foi incapaz de detectar o caso positivo e o uso de testes de detecção de ácidos nucleicos deve ser avaliado como alternativa para aumentar a segurança transfusional na área endêmica brasileira para prevenir casos de MTT.

Palavras-chave: malária, doadores de sangue, prevalência, fatores de risco, *nested PCR*.

Abstract

Objective. We estimated the prevalence and risk factors of Plasmodium infection in blood donors from the Brazilian Amazon Region (BAR). We also evaluated the validity of the clinical and epidemiological screening (CES) and laboratory screening (LS) from four blood banks (BB) selected at the BAR.

Methods: We used the results of nested PCR in pooled samples to calculate the prevalence of Plasmodium infection and the validation parameters for LS and CES. To calculate the prevalence of risk factors, we used a standardized epidemiological questionnaire.

Results: The most prevalent risk factors were: "living, working or studying in a city with Annual Parasite Index>49" (39.2 %), "living, working or studying in rural area"(3.9%); "visiting risk areas for malaria in the past 30 days"(22.6 %). The overall prevalence of Plasmodium infection was 0.07% and 0.17% among the deferred donor after CES and 0.04% among the qualified donors. Sensitivity was 50% for CES and 0% for LS.

Conclusion: The prevalence is high for risk factors of Plasmodium infection among blood donor in the BAR. This situation makes the CES a challenge to screen both blood donors in the incubation period of malaria and asymptomatic Plasmodium carrier. On the other hand, LS performed with thick blood smear has low sensitivity and the use of nucleic acid tests should be evaluated as an alternative for increasing the blood safety in the BAR to prevent potential MTT.

Introdução

A malária é endêmica na Amazônia Brasileira. Em 2011, o Sistema de Vigilância Epidemiológica da Malária da Região Amazônica (SIVEP-Malária) registrou 266.348 casos no Brasil, sendo 99,7% casos registrados na Região Amazônica brasileira¹. Desde 2005, ano em que o país registrou 607.782 casos, o número de casos notificados vem apresentando redução. Contudo, apesar dessa redução, as condições de ocupação desordenada do espaço urbano², a expansão da fronteira agrícola para áreas silvestres³ aliadas à permanência de portadores assintomáticos de infecção por *Plasmodium* (PAP)^{4,5} e o incentivo à migração de pessoas de regiões indenes para a Amazônia⁶ contribuem para que o controle da doença ainda seja um desafio nessa região.

Neste contexto, a malária transmitida por transfusão de sangue (MTT) na Amazônia se mantém como uma preocupação. Apesar de raros, os casos de MTT são usualmente muito graves^{7,8}. O risco de transmissão da malária por transfusão é pouco conhecido e subestimado⁹, em especial nos países endêmicos onde a hemovigilância ainda está em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, onde não há malária endêmica, o número médio de casos de MTT notificado é de três casos por ano⁸. No Brasil, o Sistema Nacional de Hemovigilância (SNH), criado em 2002¹⁰, registrou até hoje um total de quatro casos de MTT, sendo três em 2006 e um em 2007; todos evoluíram para óbito. Contudo, estima-se que a prevalência de infecção por *Plasmodium* em doadores aptos, em áreas endêmicas brasileiras, utilizando testes de detecção de ácidos nucleicos (NAT) do *Plasmodium*, esteja entre 0,3% a 3%^{11,12,13}. Portanto, é provável que exista subnotificação de MTT no SNH brasileiro.

Os PAP e aqueles que estão em período de incubação para malária são um desafio para a hemoterapia no que se refere à seleção dos doadores. Nos países indenes, os critérios de seleção para impedir a doação de indivíduos com risco de infecção por *Plasmodium* são altamente sensíveis e pouco específicos¹⁴. Nos Estados Unidos, ficam impedidos de doar por 12 meses os

indivíduos que viajaram para regiões endêmicas e por três anos se viveram em regiões endêmicas; não são realizados testes laboratoriais de triagem para malária. Na Europa, as viagens para regiões endêmicas provocam impedimento por quatro meses; entre quatro meses e três anos são admitidos se testes sorológicos forem negativos; se os testes sorológicos forem positivos, o indivíduo está definitivamente impedido de doar sangue.

Estes critérios causam impactos econômicos ao sistema de sangue. Nos Estados Unidos, estima-se que 50.000 doações são impedidas tendo como causa o risco de malária⁷. No Canadá, o impacto da exclusão de candidatos à doação por risco de malária, baseados apenas na avaliação dos fatores de risco, representa alto custo anual¹⁴. Apesar disso, esta alta sensibilidade não afeta a disponibilidade de sangue.

Já no contexto de países endêmicos ou com regiões endêmicas, como os países da América do Sul, critérios de seleção muito sensíveis podem gerar desabastecimento de sangue em alguns locais. No Brasil, os requisitos estabelecidos na regulação para impedir a doação de indivíduos com risco de infecção por *Plasmodium* são diferentes para a área endêmica, isto é, Região Amazônica Brasileira, e para a área não endêmica. Nas áreas indenes, a triagem laboratorial não é obrigatória, mas a triagem clínica e epidemiológica é mais sensível, tornando inapto por 12 meses o candidato que tenha se deslocado para a região Amazônica^{15,16}. ((Na área endêmica, são impedidos de doar os indivíduos que i) tiveram malária nos últimos 12 meses; ii) tiveram suspeita de malária nos últimos 30 dias; iii) residem em municípios com alto risco de transmissão, isto é, com Incidência Parasitária Anual maior que 49,9 lâminas positivas por 1.000 habitantes (IPA>49,9); iv) deslocaram-se para municípios com IPA>49,9 nos últimos 30 dias e v) tiveram malária por *Plasmodium malariae* (válido também para áreas indenes). Além disso, todos os doadores devem ser submetidos à triagem laboratorial com testes laboratoriais de detecção do *Plasmodium* ou seus antígenos^{15,16}.

Nos SH brasileiros, a gota espessa é o teste mais utilizado para a triagem laboratorial¹⁷. O exame de gota espessa tem várias limitações quando aplicado

à triagem dos doadores de sangue. As baixas parasitemias em doadores assintomáticos (em período de incubação para malária ou PAP) resultam em muito menor sensibilidade da gota espessa em comparação com os testes de detecção do NAT⁴. Além disso, os resultados da gota espessa são sujeitos a grandes variações porque o resultado do teste é dependente da habilidade e perícia dos técnicos, tanto no preparo da lâmina, que é manual, como na sua leitura. Os NAT são mais indicados para o diagnóstico dos casos com parasitemias submicroscópicas, mas não são utilizados nos SH brasileiros para a triagem laboratorial de doadores para a malária.

É diante desse cenário epidemiológico, com provável subnotificação de MTT no Brasil, existência de doadores de sangue assintomáticos para malária, ausência de triagem laboratorial utilizando testes com alta sensibilidade nos SH brasileiros, somado ao debate sobre quais critérios de exclusão são mais adequados para impedir a doação de sangue dos indivíduos com risco de infecção por *Plasmodium*, que este estudo foi conduzido. O objetivo foi de estimar as prevalências da infecção por *Plasmodium* e dos seus fatores de risco entre candidatos à doação de sangue de SH da região amazônica brasileira e estimar a acurácia da triagem clínica e epidemiológica e da triagem laboratorial para a malária realizada por esses serviços, tendo como padrão-ouro a *nested PCR*.

Material e Métodos

População de estudo

A população fonte do estudo foi composta por candidatos à doação de sangue que se apresentaram em quatro SH de três diferentes estados da região amazônica brasileira.

O período de coleta foi de novembro de 2009 a setembro de 2010, em um intervalo de tempo que variou em cada SH. No período de coleta, candidatos à doação foram abordados e aqueles que expressaram concordância em

participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram incluídos na amostra. Não houve critério de exclusão de participantes desde que o sujeito da pesquisa tenha concordado e assinado o TCLE.

Para o cálculo do tamanho da amostra utilizou-se a alocação estratificada proporcional com parâmetros fornecidos pelos próprios SH. Os estratos foram os quatro SH e para cada um foi estimado o tamanho da amostra segundo os seguintes parâmetros: número de triagens clínicas de candidatos à doação realizadas mensalmente, número de doadores aptos à doação e número de doadores inaptos à doação por qualquer motivo. Estimou-se uma prevalência de 3% de doadores aptos positivos para *Plasmodium* spp, utilizando a *nested PCR* como método de detecção de ácido nucleico¹². Para os candidatos à doação inaptos, utilizou-se 5% de prevalência. Baseado nesses parâmetros, para um nível de confiança de 95% e erro relativo aceito de 20% (ou erro absoluto de 0,6%) para a amostra de doadores aptos e de 25% (ou erro absoluto de 1,25%) em torno da prevalência esperada, o tamanho amostral mínimo requerido foi 2.695 candidatos à doação, distribuídas conforme demonstrado o quadro 1.

Quadro 1. Distribuição percentual por estrato (serviço de hemoterapia) e número total de indivíduos segundo o cálculo da amostra estratificada proporcional.

Serviços de hemoterapia	Candidatos por mês* (N)	População		Amostra	
		Aptos** (%)N=6.546	Inaptos** (%)N=1.955	Aptos (%)n=2.165	Inaptos (%) n=530
A	-	65	35	68	32
B	-	80	20	82	18
C	-	73	27	76	24
D	-	78	22	80	20
Total	8.501	77	23	80	20
			Total da amostra (n)		2.695

* Valores fornecidos pelos SH e omitidos para evitar identificação dos SH.

** Após entrevista clínica e epidemiológica. Valores fornecidos pelos SH.

Para compensar desistências, perdas ou insuficiência de material biológico adequado, a esse número foi acrescido 10%, distribuídos para cada um dos estratos, resultando em uma amostra de 2.965 candidatos a doação.

Nested PCR para detecção de infecção por Plasmodium sp

Foram coletados aproximadamente 3,0 mL de sangue total em tubos com anticoagulante de cada participante. As amostras foram mantidas refrigeradas a 4°C até a formação dos *pools*. Os testes da *nested PCR* foram executados em *pools* de até 2,5 mL de sangue total composto por alíquotas de 0,5 mL de até cinco diferentes amostras individuais. A sensibilidade da *nested PCR* para estas condições foi verificada previamente e alcançou o valor de 95,2% (IC95%: 76,2% a 99,99%) para uma parasitemia de 0,2 parasito por microlitro no *pool* de até 5 amostras¹⁷. Após a formação dos *pools*, as amostras individuais e os *pools* foram congelados a -20°C até o processamento.

i. Extração de DNA. Um volume de 2,5 mL de sangue total foi utilizado para a extração do DNA para a PCR. A extração foi realizada utilizando o kit de extração Wizard® Genomic (Kit de Purificação de DNA) da Promega®, conforme instruções do fabricante. Após o passo de reidratação, o DNA foi usado imediatamente para amplificação ou foi armazenado a 2-8°C até sua utilização.

ii. Amplificação. Foi utilizado o método da *nested PCR* previamente descrito por Snounou et al. (1993) [15]. A única modificação introduzida foi à utilização de kit comercial de mistura de reagentes em substituição ao protocolo original. Esta estratégia tem como alvo sequências para a amplificação dos genes das subunidades ribossomais 18S das três espécies de *Plasmodium* prevalentes na região amazônica, o *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Para amplificação do gênero foram usados os *primers* rPLU5 e rPLU6. Para a amplificação específica de espécie se usou os *primers* rVIV1 e rVIV2 para *P. vivax*, rFAL1 e rFAL2 para *P. falciparum* e rMAL1 e rMAL2 para *P. malariae*. Para reduzir o

risco de contaminação e de erros de pipetagem durante a preparação da mistura de reagentes (mix), utilizou-se o PCR Master Mix da Promega®. O volume final da reação foi de 25,0 µL incluindo: 20,0 µL de PCR Master Mix (0,6 unidades de Taq DNA polimerase, 400 µM de cada DNTP, 3,0 mM de MgCl₂ e tampão Tris pH 8,5), 1,0 µL de cada um dos *primers* a 6,25 µM, e 3,0 µL da amostra de DNA. Todos os *primers* foram adquiridos da IDT® (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, EUA). As amostras foram amplificadas utilizando um termociclador (Mastercycler® Pro Eppendorf Scientific Inc., Westbury, NY, EUA). Foram usados 25 e 30 ciclos de amplificação para a reação de amplificação do gênero e da espécie, respectivamente.

iii. Detecção. Para visualizar os produtos da *nested PCR* foi utilizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio. A visualização da eletroforese foi realizada sob luz ultravioleta, sendo utilizado um sistema de documentação fotográfica. Em todas as corridas eletroforéticas foi utilizado um marcador de 1 kb (Invitrogen, Inc., EUA), para estimar o peso molecular dos fragmentos de DNA amplificados.

Coleta, processamento e análise dos dados

As variáveis de interesse para o estudo foram coletadas por questionário epidemiológico padronizado e incluíram as variáveis demográficas e fatores de risco para malária, a saber: exposição frequente à área rural (moradia, trabalho ou estudo), exposição em áreas de risco nos últimos 30 dias (áreas rurais, silvestres e garimpos), exposição em municípios com IPA>49,9 [procedentes (moradia, trabalho, estudo) ou deslocamentos nos últimos 30 dias] e histórico de malária (suspeitas e confirmadas). O IPA do município foi obtido do SIVEP-Malária. Foram considerados indivíduos “suspeitos de malária nos últimos 30 dias” os que responderam positivamente se tinham se submetido ao teste da gota espessa nos últimos 30 dias.

Para os candidatos à doação aptos na triagem clínica e epidemiológica dos SH coletou-se ainda o resultado da triagem laboratorial para malária. Foram considerados candidatos à doação aptos na triagem clínica e epidemiológica os doadores que efetuaram a doação nos SH. Para os candidatos à doação inaptos, coletou-se o motivo da inaptidão.

As prevalências de malária e dos fatores de risco, com seus respectivos intervalos de 95% de confiança (IC95%), foram estimados com base nos resultados da *nested PCR* e das respostas ao questionário padronizado, respectivamente. Os parâmetros de validade da triagem clínica e epidemiológica e da triagem laboratorial dos SH (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo) foram calculados utilizando os resultados da *nested PCR* como padrão-ouro.

Aprovação por comitês de ética em pesquisa com seres humanos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller da Universidade Federal do Mato Grosso (Registro nº 640/09) e pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Registrar nº 028/2009).

Resultados

Foram incluídos na amostra 2.992 indivíduos, sendo 2.388 (80%) candidatos aptos na triagem clínica e epidemiológica realizada pelos SH e 604 (20%) candidatos inaptos. Comparado ao grupo dos aptos, o grupo dos inaptos era mais jovens, com menor predominância do sexo masculino (74,0% para os aptos VS 55,6% para os inaptos), maior proporção de estudantes e menor de proporção de trabalhadores. A Tabela 1 apresenta as características gerais dos candidatos à doação pesquisados.

Os principais motivos de inaptidão na triagem clínica e epidemiológica realizada pelos SH estão apresentados na figura 1. Na primeira etapa da

triagem, ter hematócrito anormal foi o principal motivo de inaptidão em ambos os sexos. Na segunda etapa, destaca-se que a exclusão pelo risco associado à infecção por malária foi o principal motivo de inaptidão entre as mulheres (30%), seguido de comportamento sexual de risco (16%) e uso de medicamentos (15%). Entre os homens, o risco associado à infecção por malária foi a segunda causa de inaptidão (24%), ficando abaixo apenas do comportamento sexual de risco (29%). Destaca-se que os dados de inaptidão clínica e epidemiológica dos candidatos à doação do SH-B não estavam disponíveis para os pesquisadores. Foi informado apenas que não houve inaptidão na segunda etapa da triagem por risco de infecção por malária ou na terceira etapa por exame positivo para malária. Portanto, o total de candidatos à doação analisados na figura 1 foi 402 indivíduos.

Dentre os motivos de inaptidão pelo risco de infecção por malária, o deslocamento para áreas com alto risco para malária foi responsável por 87% das inaptidões, seguido de febre há menos de 30 dias (11%) e malária nos últimos 12 meses (3%).

As prevalências dos fatores de risco que foram coletados por meio do questionário epidemiológico estão apresentadas na tabela 2. Entre os candidatos à doação aptos pelo SH, destacam-se os fatores de risco “moradia, trabalho ou estudo em municípios com IPA>49,9” com prevalência de 40,0% (IC95%: 38,0% a 40,2%), “deslocamentos para áreas de risco (fazendas, sítios, chácaras, locais com matas ou florestas e garimpos)”, que alcançou 19,3% (IC95%: 17,8% a 21,0%), e o “deslocamento para municípios com IPA>49,9” com 3,3% (IC95%: 2,6% a 4,1%). Dentre os fatores de risco para malária assintomática, os candidatos à doação aptos apresentaram média de 26,7 anos de residência na área endêmica (IC95%: 26,3% a 27,1%); 8,9% (IC95%: 7,8% a 10,1%) deles relataram ter tido dois ou mais episódios de malária na vida e 14,1% (IC95%: 12,8% a 15,6%) relataram ter tido ao menos um episódio de malária na vida.

Utilizando o questionário padronizado, foi calculado o percentual de candidatos à doação que seriam impedidos de doar pelos critérios estabelecidos na

Portaria MS nº 2.712/2013¹⁶. Entre os candidatos à doação considerados aptos pelos SH, 42,0% (IC95%: 40,1% a 44,1%) apresentaram um ou mais fatores impeditivos a doação. Vale destacar que dois SH estavam localizados em municípios com IPA>49,9 durante o período do estudo, mas coletaram sangue regularmente dos moradores da cidade. Se não considerarmos o critério “município de moradia, trabalho ou estudo do doador com IPA>49,9”, ainda assim 5,3% (IC95%: 4,4% a 6,3%) apresentaram um ou mais fatores impeditivos a doação pelos critérios da Portaria 2.712/2013¹⁶, de acordo com as informações coletadas no questionário epidemiológico (dados não apresentados). Entre esses, destacam-se dois candidatos à doação que relataram ter tido malária por *P. malariae* (dados não apresentados), outro que relatou ter tido malária nos últimos 30 dias e 45 candidatos à doação que relataram terem sido suspeitos de malária nos últimos 30 dias (tabela 2).

Em relação à prevalência de infecção por *Plasmodium*, dois indivíduos foram positivos na *nested PCR*, sendo um apto e outro inapto na triagem clínica e epidemiológica do SH, ambos para a espécie *P. vivax* e pertencentes ao SH-B. A tabela 3 apresenta a prevalência geral obtida no estudo e entre os candidatos à doação considerados aptos e inaptos pelos SH. A prevalência geral foi de 0,07% [n=2/2.992 (IC95%: 0,01% a 0,27%)]. No SH-B, a prevalência total foi de 0,18% (IC95%: 0,03% a 0,71%); entre os aptos de 0,11% (IC95%: 0,01% a 0,69%) e entre os inaptos de 0,50% (IC95%: 0,01% a 2,73%).

Os parâmetros da validade da triagem clínica e epidemiológica e da triagem laboratorial dos SH estão detalhados na tabela 3. A triagem clínica e epidemiológica realizada pelo SH foi capaz de excluir um dos dois casos positivos de infecção por *Plasmodium* (sensibilidade = 50%). Contudo, a triagem laboratorial realizada com o teste da gota espessa não conseguiu detectar a infecção no doador considerado apto, apresentando sensibilidade de 0%. Vale destacar que o SH-D realizou a triagem laboratorial em apenas 1,5% dos doadores, pois adotava o critério de submeter à triagem laboratorial apenas os doadores provenientes de municípios considerados de médio risco

pelo IPA ($9,9 > \text{IPA} < 50$). Essa conduta é distinta da preconizada na norma vigente à época, e na atual, que exigem a triagem universal nos municípios com “transmissão ativa”. Portanto, o número de doadores efetivamente submetidos a um teste laboratorial foi 1.206 (50,5%).

Os dois casos positivos na *nested PCR*, Caso 1 e Caso 2, para infecção por *Plasmodium* eram do sexo masculino, nascidos na região Amazônica, moradores da área urbana e não estavam estudando. Caso 1 tinha 19 anos de idade, era soldado, trabalhava na área urbana e foi considerado inapto pelo SH-B por motivo não informado aos pesquisadores. Caso 2 tinha 30 anos de idade, estava desempregado e foi considerado apto. Os fatores de risco relatados pelos dois indivíduos foram “morar, trabalhar ou estudar em município com $\text{IPA} > 49,9$ ” e “deslocamento para áreas de risco nos últimos 30 dias”. Os dois relataram já terem tido malária na vida; Caso 1 relatou ter tido um episódio de malária, mas não lembrou a espécie de *Plasmodium*, enquanto que Caso 2 relatou dois episódios por *P. vivax* na vida. Apesar de Caso 2 ter sido considerado apto pelo SH-B, ele estaria impedido de doar segundo a Portaria 2.712/2013 pelo critério “residir em (proveniente de) município com $\text{IPA} > 49,9$ ”. Os pesquisadores tentaram contatar os indivíduos positivos para saber se haviam desenvolvido malária após a entrevista, mas eles não estavam mais disponíveis. As informações sobre o destino dos hemocomponentes do Caso 2 e sobre os eventuais receptores desses produtos também não foram disponibilizadas aos pesquisadores até o momento.

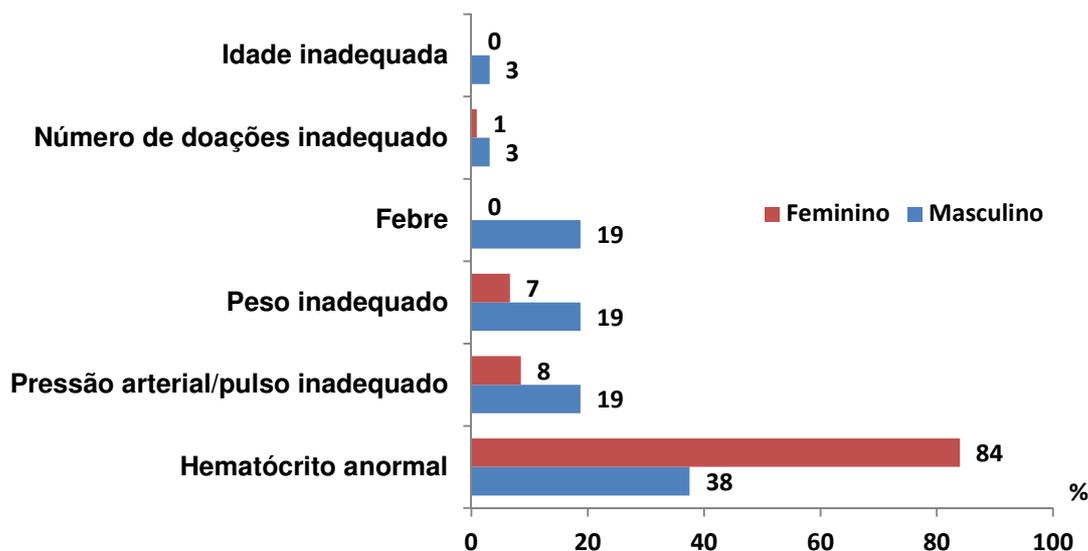
Tabela 1. Características dos candidatos à doação de sangue de quatro serviços de hemoterapia (A, B, C e D) da Região Amazônica, Brasil, 2009 a 2010.

	A		B		C		D		Total (n=2.992)	
	Aptos	Inaptos	Aptos	Inaptos	Aptos	Inaptos	Aptos	Inaptos	Aptos(n=2.388)	Inaptos (n=604)
Idade [media \pm DP]	27,8 \pm 5,9	28,7 \pm 9,3	29,0 \pm 8,6	26,4 \pm 8,4	29,0 \pm 7,8	29,1 \pm 8,9	31,5 \pm 9,7	28,7 \pm 10,0	30,2 \pm 9,1	28,0 \pm 9,4
Sexo masculino (%)	60,0	52,9	66,5	62,9	79,8	61,6	79,0	49,7	74,0	55,6
Trabalhador (%)	80,0	82,3	77,8	73,8	82,5	65,8	80,0	64,0	79,5	68,0
Estudante (%)	32,0	35,3	30,6	39,1	33,3	38,4	25,9	34,6	28,5	36,6
Moradia Urbana (%)	96,0	88,2	99,5	99,0	95,6	98,5	99,7	97,1	99,2	97,6
Peso (Kg) [média \pm DP]	74,8 \pm 14,9	72,4 \pm 13,5	74,7 \pm 15,3	71,4 \pm 15,2	76,9 \pm 14,4	75,6 \pm 19,0	75,4 \pm 14,0	69,9 \pm 15,7	75,3 \pm 14,6	71,2 \pm 16,0
Altura(cm) [média \pm DP]	168 \pm 7	167 \pm 7	169 \pm 9	168 \pm 8	168 \pm 8	167 \pm 9	168 \pm 11	165 \pm 11	168,3 \pm 10,2	166,0 \pm 9,8
Hematócrito (%)	44,9 \pm 3,9	44,3 \pm 4,8	43,8 \pm 4,4	42,3 \pm 4,4	43,7 \pm 2,9	42,2 \pm 3,1	43,7 \pm 3,3	37,4 \pm 5,3	43,7 \pm 3,7	40,8 \pm 5,1

DP = desvio padrão.

Figura 1: Distribuição percentual dos motivos de inaptidão de candidatos à doação de sangue, por sexo, na primeira (a) ou segunda (b) etapa da triagem clínica e epidemiológica em três serviços de hemoterapia (A, C e D) (n=402 candidatos à doação), Brasil, 2009 e 2010.

a) Primeira etapa da triagem: masculino n = 32; feminino n = 106



b) Segunda etapa da triagem: masculino n = 178; feminino n = 86

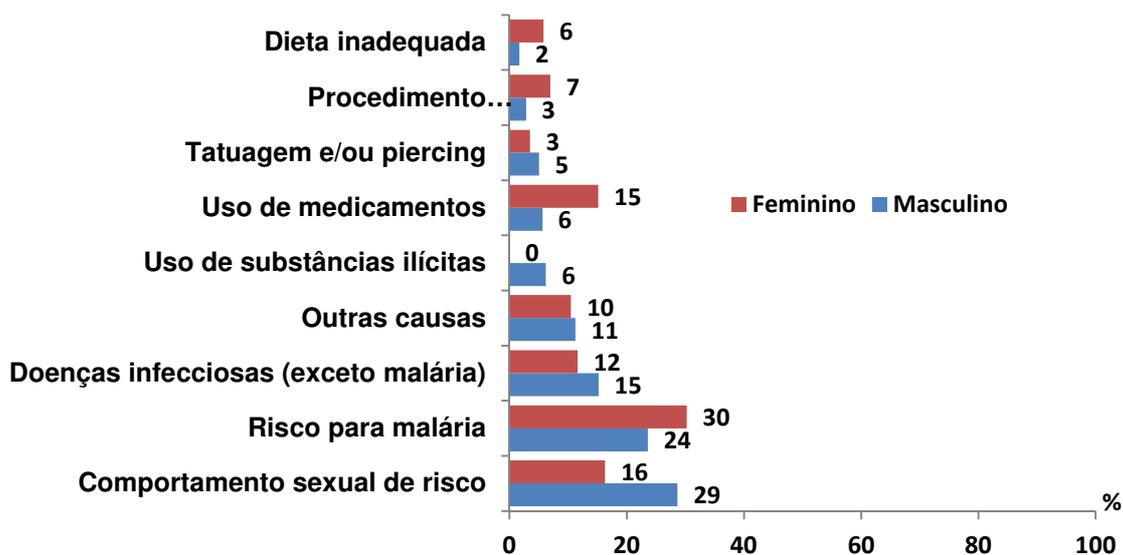


Tabela 2. Prevalência [P (%)] e intervalos de 95% de confiança (IC95%) de fatores de risco para infecção por *Plasmodium* em candidatos à doação de sangue de quatro serviços de hemoterapia da região amazônica, Brasil, 2009 a 2010.

Fatores de risco*	Aptos:P(IC95%) n=2.388	Inaptos:P (IC95%) n=604	Total:P (IC95%) n=2.992
Anos de residência na região amazônica (média)	26,7 (26,3-27,1)	25,2 (24,4-26,0)	26,4 (26,0-26,8)
Exposição frequente a zona rural (MTE**)	3,7 (3,0-4,5)	5,0 (3,4-7,1)	3,9 (3,3-4,7)
Moradia	0,9 (0,6-1,4)	2,3 (1,3-4,0)	1,2 (0,9-1,7)
Trabalha	2,1 (1,6-2,8)	2,2 (1,2-3,8)	2,1 (1,6-2,7)
Estuda	1,1 (0,7-1,6)	1,7 (0,8-3,1)	1,2 (0,9-1,7)
Deslocamentos nos últimos 30 dias para áreas de risco***	19,3 (17,8-21,0)	35,4 (31,6-39,4)	22,6 (21,1-24,1)
MTE em municípios com IPA do ano anterior >49,9****	40,0 (38,0-42,0)	35,9 (32,1-39,9)	39,2 (37,4-41,0)
MTE em municípios com IPA atual >49,9*****	40,0 (38,0-42,0)	35,9 (32,1-39,9)	39,2 (37,4-41,0)
Deslocamentos há menos de 30 dias para municípios com IPA do ano anterior >49,9****	3,4 (2,7-4,2)	7,0 (5,1-9,4)	4,1 (3,4-4,9)
Deslocamentos há menos de 30 dias para municípios com IPA atual >49,9*****	3,3 (2,6 – 4,1)	6,1 (4,4-8,4)	3,9 (3,2-4,7)
Malária nos últimos 12 meses	<0,1 (0,0-0,3)	1,0 (0,4-2,3)	0,2 (0,1-0,5)
Malária nos últimos 30 dias	<0,1 (0,0-0,3)	0,2 (0,0-1,1)	0,1 (0,0-0,3)
Episódios de malária na vida (média)	0,5 (0,4-0,6)	0,8 (0,4-1,2)	0,6 (0,5-0,7)
Faixas de episódios de malária na vida			
0	75,2 (73,4-76,9)	74,7 (71,0-78,1)	75,1 (73,5-76,6)
1	14,1 (12,8-15,6)	13,3 (10,7-16,3)	13,9 (12,7-15,2)
2-5	7,4 (6,4-8,6)	7,5 (5,5-9,9)	7,4 (6,5-8,4)
6-10	1,1 (0,7-1,6)	1,7 (0,8-3,1)	1,2 (0,8-1,6)
>10 -20	0,2 (0,1-0,5)	0,2 (0,0-1,1)	0,2 (0,1-0,5)
21 ou mais	0,2 (0,1-0,5)	0,7 (0,2-1,8)	0,3 (0,2-0,6)
Não sabe	1,8 (1,3-2,4)	2,2 (1,2-3,8)	1,9 (1,4-2,4)

Continuação da tabela 2.

Fatores de risco*	Aptos p (IC95%)	Inaptos p (IC95%)	Total p (IC95%)
Testado para malária nos últimos 12 meses	8,6 (7,6-9,8)	12,9 (10,4-15,9)	9,5 (8,5-10,6)
Testado para malária nos últimos 30 dias	1,9 (1,4-2,5)	4,1 (2,8-6,1)	2,3 (1,8-3,0)
Testes positivos para malária durante a vida (média)	0,5 (0,4-0,6)	0,8 (0,4-1,2)	0,6 (0,5-0,7)
Faixas de testes positivos para malária durante a vida			
0	75,3 (73,5-77,0)	75,2 (71,5-78,5)	75,3 (73,7-76,8)
1	12,4 (11,1-13,8)	13,1 (10,6-16,1)	12,5 (11,4-13,8)
2-5	6,8 (5,8-7,9)	5,6 (4,0-7,9)	6,6 (5,7-7,1)
6-10	1,4 (1,0-2,0)	1,5 (0,7-2,9)	1,4 (1,0-1,9)
>10 – 20	0,4 (0,2-0,8)	0,2 (0-1,1)	0,4 (0,2-0,7)
21 ou mais	0,1 (0-0,4)	0,7 (0,2-1,8)	0,2 (0,1-0,5)
Não sabe	3,6 (2,9-4,4)	3,8 (2,5-5,8)	3,6 (3,0-4,4)

* Médias para variáveis contínuas e prevalências(%)para variáveis categóricas com seus intervalos de confiança a 95%.

** MET = moradia, trabalho ou estudo.

*** Fazendas, sítios, chácaras, locais com matas ou florestas e garimpos.

**** Índice parasitário anual > 49,9 lâminas positivas por 1.000 habitantes no ano anterior ao da entrevista.

***** Índice parasitário anual >49,9 lâminas positivas por 1.000 habitantes no segundo mês anterior ao mês da entrevista

Tabela 3: Valores dos parâmetros de acurácia da validade da triagem clínica, epidemiológica e laboratorial de quatro serviços de hemoterapia da Região Amazônica Brasileira, tendo como padrão-ouro a *nested PCR*, Brasil 2009 a 2010.

Triagem clínica e epidemiológica		<i>nested PCR</i>		Total	P (IC95%)*
		Positivo	Negativo		
Qualquer motivo	Inapto	1	603	604	0,17 (0,01 a 1,07)
	Apto	1	2.387	2.388	0,04 (0,00 a 0,27)
	Total	2	2.990	2.992	0,07 (0,01 a 0,27)
Sensibilidade = 50,00%					
Especificidade = 79,83%					
VPP = 0,17%					
VPN = 99,96%					
Malária**	Inapto	0	68	68	
	Apto	1	2.387	2.388	
	Total	1	2.455	2.456	
Sensibilidade = 0%					
Especificidade = 97,23%					
VPP = 0%					
VPN = 99,96%					
Triagem laboratorial para malária (doadores aptos)		Positivo	Negativo		
Positivo		0	0	0	
Negativo/não realizado		1	2.387	2.388	
Total		1	2.387	2.388	
Sensibilidade = 0%					
Especificidade = 100%					
VPP = 0%					
VPN = 99,96%					

* Prevalências e intervalos de confiança a 95% em percentual (%)

Discussão

Este é o primeiro trabalho que estima a prevalência de fatores de risco para infecção por *Plasmodium* em candidatos à doação de sangue da Amazônia brasileira. Os fatores de risco mais prevalentes foram morar, trabalhar ou estudar em município com IPA >49, ter visitado áreas de risco para malária (rural, silvestre ou garimpo) e morar, trabalhar ou estudar na zona rural. Além disso, foi estimada a prevalência de infecção por *Plasmodium* entre candidatos à doação e nossos resultados foram menores que os encontrados em estudos anteriores^{11,12,13}. Mostrou-se ainda que, corroborando com os estudos anteriores^{11,12,13}, tanto a triagem clínica e epidemiológica como a triagem laboratorial dos SH selecionados não foram capazes de excluir todos os candidatos à doação infectados com o *Plasmodium*.

O risco de infecção por malária foi o principal motivo de inaptidão entre as mulheres e o segundo entre os homens considerados inaptos na segunda etapa da triagem. Porém, nenhum doador inapto por esse motivo foi positivo na *nested PCR*. Shehata *et al.* (2004)¹⁴ estimou que o custo no Canadá de um doador considerado inapto temporariamente na triagem clínica e epidemiológica é de \$ 210,00 dólares canadenses (aproximadamente R\$ 450,00). Nestes custos estão incluídos tanto o trabalho de seleção do doador como o de recrutamento de mais doadores para compensar os impedidos de doar. Além disso, estima-se que de 40% a 80% dos candidatos à doação que são impedidos nunca mais retornam para doar¹⁴. Portanto, ao se estabelecer critérios de seleção na triagem clínica e epidemiológica com alta sensibilidade, estes custos devem ser considerados, em especial se os fatores de risco avaliados são altamente prevalentes e pouco preditivos da infecção no indivíduo.

No presente estudo dois candidatos à doação assintomáticos no momento da doação foram identificados como positivos na *nested PCR* para infecção por *Plasmodium*, sendo que um foi considerado apto à doação após a triagem clínica e epidemiológica do SH. As técnicas de seleção de doadores deveriam

ser capazes de identificar os candidatos que estão em período de incubação da malária ou que sejam portadores assintomáticos do *Plasmodium*. Estes achados corroboram com estudos anteriores realizados tanto na Amazônia brasileira^{11,12,13} como em outras áreas endêmicas¹⁹ de que o processo de triagem para malária apresenta constantemente imperfeições que permitem que transfusões com sangue contaminado com *Plasmodium* sejam realizadas. Na ausência de uma triagem laboratorial com alta sensibilidade, a maior responsabilidade pela exclusão dos candidatos sob risco de malária recai sobre a triagem clínica e epidemiológica. Nossos resultados mostram que todos os casos positivos no NAT seriam impedidos de doar pelos critérios de seleção já existentes na legislação brasileira, mais especificamente pelo critério “residir em município com IPA>49,9”. Por outro lado, se este critério fosse corretamente aplicado em todos os candidatos à doação pesquisados, poderia gerar o desabastecimento de sangue com a paralisação da coleta em alguns SH da região Amazônica, já que o percentual de resultados falsamente positivos na triagem clínica e epidemiológica (inaptos com resultado negativo na *nested PCR*) dos SH avaliados chegaria a 40%.

Além disso, nossos resultados mostram que a prevalência da exposição aos fatores de risco para malária entre os candidatos à doação é muito alta, tanto para os fatores já previstos na regulação brasileira como para outros destacados na literatura como relevantes. Dentre os fatores de risco socioambientais para malária nas áreas endêmicas estão moradia próxima a florestas²⁰, morar em localidade com mais de 1.000 casas/Km²²¹, morar em casas com parede de barro²¹, trabalhar em garimpo/mineração²², trabalhar em atividades rurais^{22,23}, entre outros. Destaca-se, ainda, que o Ministério da Saúde brasileiro aponta que, de 2001 a 2011, 67% dos casos de malária registrados na Amazônia ocorreram em zona rural ou garimpos¹. Todos esses fatores são relevantes para avaliação do risco de candidatos à doação que podem estar no período de incubação da malária. Apesar disso, a regulação brasileira não prevê explicitamente a avaliação dessas exposições nos critérios de seleção.

Tendo como base a epidemiologia da doença, acredita-se que essas exposições deveriam ser consideradas como fatores de risco para inaptidão temporária à doação de sangue. Contudo, nossos resultados mostram que a prevalência da exposição a áreas de risco como matas, garimpos, florestas, foi de cerca de 20%. Além disso, outros 4% relataram morar, estudar ou trabalhar na zona rural. Se estas exposições também fossem consideradas como um motivo de inaptidão, assim como já é considerada a exposição “deslocamentos para municípios com IPA>49,9”, certamente haveria grande redução no número de doações.

Em relação aos PAP, as dificuldades para sua identificação são ainda maiores. Os atuais critérios de seleção da legislação brasileira não incluíram os fatores de risco para se identificar esses indivíduos. Porém, essa é uma situação que não pode ser ignorada pelos SH, pois a prevalência desses indivíduos é alta nas áreas urbanas²⁴. Tanto os fatores de risco como a epidemiologia da malária assintomática não são bem esclarecidos no Brasil. A idade mais velha^{3,4} e o maior tempo de moradia em área endêmica⁴ são os fatores de risco mais comumente apontados para os portadores assintomáticos de malária. O número de episódios de malária na vida também parece ser fator de risco para que o indivíduo se torne portador assintomático da malária²⁵. Cerávolo *et al.*(2005)²⁶ encontrou maior concentração plasmática de anticorpos anti-DBP (proteína de ligação ao Duffy) do *P. vivax* em indivíduos com maior número de infecções prévias de malária. A DBP é uma proteína essencial na ligação do merozoíto do *P. vivax* ao eritrócito e a produção de anti-DBP é um fator de proteção contra a infecção. Contudo, não se tem estabelecida a faixa ou número de episódios de malária que poderia prever a presença de infecção assintomática de malária no indivíduo em condições de baixa transmissão como no Brasil.

Sendo assim, estabelecer critérios de seleção que considere os fatores de risco para os portadores assintomáticos de malária é um grande desafio. É evidente que o tempo de exposição a áreas endêmicas não pode ser considerado como critério de exclusão, pois é muito provável que a grande maioria dos doadores

tenha nascido ou vivido por décadas na zona endêmica brasileira. Porém, se considerarmos o critério “ter tido dois ou mais episódios de malária na vida” como um motivo de inaptidão, nossos resultados apontam que aproximadamente 10% dos candidatos à doação aptos pelo SH se tornariam inaptos. O impacto parece ser menor se comparado às exposições ambientais apresentadas anteriormente. Contudo, como a condição de ter tido malária não pode ser alterada ao longo do tempo, a inaptidão por esse critério epidemiológico seria definitiva, o que novamente impactaria na disponibilidade de doadores, em especial em alguns municípios da região norte que sabidamente já possuem alta prevalência de hepatite B. Este resultado reforça a necessidade de se estabelecer um algoritmo de seleção dos doadores sob risco de malária que inclua uma triagem laboratorial com testes de alta sensibilidade para detecção da infecção por *Plasmodium* como o NAT.

Os testes laboratoriais tradicionalmente utilizados para diagnóstico da malária (gota espessa, esfregaço e testes imunocromatográficos) nos SH brasileiros¹⁷ não possuem sensibilidade suficiente para a identificação seja de casos assintomáticos ou em período de incubação⁴. A triagem laboratorial de doadores para as áreas endêmicas brasileiras utilizando NAT é uma alternativa que vem sendo sugerida^{11,12,13}. O NAT já é utilizado nos SH brasileiros para detecção do Vírus da Hepatite C (HCV) e do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Mas, em consulta realizada no sítio eletrônico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em 28 de fevereiro de 2014, não foram encontrados kits para diagnóstico de malária registrados naquele órgão que utilizem o NAT como tecnologia. Porém, isto não impede que os testes utilizados em pesquisas científicas sejam validados para uso na triagem laboratorial de doadores nos SH brasileiros e autorizados extraordinariamente pela Anvisa até que testes para este fim sejam registrados. De fato, a Portaria 1.356/2011¹⁶ não obriga que os testes para triagem laboratorial da malária sejam registrados na Anvisa. Com avanço das técnicas de purificação do DNA em sangue total, o limite de detecção do NAT pode chegar a 0,002 parasito por microlitro de sangue total²⁷. O teste da gota espessa, na prática dos

laboratórios de diagnóstico, é capaz de detectar 100 parasitos por microlitro²⁸. Portanto, a implantação do NAT para a triagem laboratorial de doadores nas áreas endêmicas pode representar um ganho imenso na sensibilidade da detecção do *Plasmodium*.

A prevalência geral encontrada neste estudo foi menor que em outros estudos que utilizaram o NAT para detecção do *Plasmodium*^{11,12,13}. Algumas explicações merecem ser mencionadas para justificar as diferenças encontradas. Primeiro, vale ressaltar que, diferentemente do presente trabalho, os estudos anteriores utilizaram amostras de conveniência e dois deles^{12,13} incluíram SH localizados em áreas com alta incidência da doença. Por outro lado, o presente estudo ao utilizar uma amostragem probabilística, privilegiou a representatividade dos doadores atendidos nos SH selecionados, prevenindo assim possível viés de seleção que poderia distorcer (superestimar) as prevalências de positivos. Adicionalmente, em relação aos testes laboratoriais, vale destacar que uma quantidade das amostras biológicas utilizadas no presente estudo foi enviada para outro laboratório para confirmação dos resultados, demonstrando a acurácia dos resultados encontrados. Finalmente, dois estudos^{11,13} utilizaram NAT diferentes dos utilizados no presente trabalho e nenhum dos estudos revisados utilizou *pool* de amostras de sangue. É possível que a sensibilidade alcançada com a formação dos *pools* de cinco amostras¹⁷, apesar de alta, não tenha sido suficiente para detectar os casos assintomáticos, em especial os PAP, pois estudos têm mostrado que a prevalência de PAP em áreas urbanas na Amazônia pode atingir valores tão altos quanto 26% em adultos²⁴. Considerando a baixa prevalência obtida no presente estudo, não foi possível descrever cenários que pudessem melhor prever os fatores de risco para infecção por *Plasmodium*.

Outro fator que pode explicar as baixas prevalências encontradas foi o período de tempo utilizado para se atingir a amostra mínima. Por limitações operacionais e custos, o intervalo máximo de tempo para coleta das amostras foi de 4 meses (20 dias em um dos SH). É possível que se tivéssemos

distribuído a coleta ao longo do ano, incluindo os períodos de pico da incidência da doença, a prevalência encontrada poderia ter sido maior.

Em relação à validação da triagem clínica e epidemiológica e da triagem laboratorial, vale destacar que os SH não possuem procedimentos padronizados entre eles para a aplicação dos requisitos exigidos nas normas. Por exemplo, o SH-D não executava triagem laboratorial em todos os doadores e o SH-B não aplicava todos os critérios de exclusão da triagem clínica e epidemiológica. Portanto, a generalização dos resultados da validação para a região amazônica deve ser feito com cautela.

Outra limitação do estudo é que o SH-B, apesar de concordar com a realização da pesquisa no seu ambiente, até o momento não permitiu o acesso às informações dos resultados da triagem clínica e epidemiológica dos seus candidatos à doação. Portanto, a descrição dos motivos de inaptidão e o resultado da validação da triagem clínica e epidemiológica estão apresentados com um número de indivíduos menor que o das outras análises. Além disso, não obtivemos o resultado da transfusão dos hemocomponentes do doador Caso 2 e não sabemos se os casos positivos eram PAP ou estavam em período de incubação da malária.

Recomendações

Com nossos resultados mostrando a alta prevalência de fatores de risco para a malária entre candidatos a doação, aliado a outros estudos que também apontam que a triagem laboratorial baseada na gota espessa não consegue detectar os casos positivos de infecção por *Plasmodium*, acredita-se que maior ênfase deva ser dada na adoção de testes de alta sensibilidade para a triagem laboratorial de doadores de sangue nessa região. Para tanto, recomenda-se que seja realizada uma avaliação de custo-efetividade sobre a implantação de NAT de alta sensibilidade para triagem laboratorial em SH da região Amazônica. Essa avaliação pode oferecer evidências sobre quais áreas o NAT deve ser empregado, considerando as diferenças da situação epidemiológica

nas diferentes áreas onde os SH estão localizados. Vale destacar que SH com coleta expressiva de sangue estão localizados em municípios que ainda estão ou possuem bairros com IPA de médio (IPA >9,9 e <49,9) e alto risco (IPA >49,9) para malária como Manaus, Tabatinga e Itacoatiara no Estado do Amazonas, Porto Velho em Rondônia, Altamira no Pará, Macapá e Santana no Amapá e Cruzeiro do Sul no Acre.

Além disso, para reduzir a letalidade da MTT, recomenda-se que sejam estabelecidos protocolos de hemovigilância específicos para as reações febris tardias pós-transfusionais para serem implantados em todos os SH da Amazônia com vistas ao diagnóstico e tratamento precoces da MTT. A implantação da hemovigilância ainda é deficiente na maioria dos Hemocentros coordenadores da região Amazônica¹⁷ e um esforço das autoridades competentes deve ser realizado para esse fim.

Conclusão

Este estudo reafirma que a prevenção da MTT se mantém como desafio para os SH das áreas endêmicas para malária que precisam equilibrar o acesso ao sangue com a segurança transfusional. O cenário apresentado com alta prevalência de fatores de risco para infecção por *Plasmodium* revela que não é possível utilizar a triagem clínica e epidemiológica para excluir todos os candidatos à doação com exposições aos fatores de risco relevantes para a malária, como se faz para outras doenças transmitidas pelo sangue, sob o risco de se gerar desabastecimento de sangue na área endêmica para malária. Por outro lado, a gota espessa, que é o teste laboratorial adotado atualmente pelos SH na triagem de doadores, também é limitada em sua sensibilidade para detecção de indivíduos assintomáticos. O uso de NAT de alta sensibilidade parece ser promissor e o custo-efetividade do teste necessita ser avaliado nos diferentes cenários de incidência da doença e prevalência de portadores assintomáticos do *Plasmodium*.

Agradecimentos

Ao CNPq e Anvisa pelo financiamento deste estudo. Aos SH participantes por permitirem o acesso aos dados dos doadores e às instalações.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. Boletim Epidemiológico 2013;44(1). Disponível em http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Abr/12/boletim_1_de_2013_malaria.pdf. Acessado em 28/11/2013.
2. Gil LHS, Tada MS, Katsuragawa TH, Ribolla PEM, Pereira-da-Silva, LH. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(3):271-6.
3. Ladeia-Andrade S, Ferreira UM, Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-Dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon basin of Brazil. Am J Trop Med Hyg 2009;80(3):452-9.
4. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Pereira-da-Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. Am J Trop Med Hyg 2002;66(6):641-8.
5. Tada MS, Marques RP, Mesquita E, Martha RCD, Rodrigues JA, Costa JDN, Pepelascov RR, Katsuragawa TH, Pereira-da-Silva, LH. Urban malaria in the Brazilian Western Amazon Region I. High prevalence of asymptomatic carriers in an urban riverside district is associated with a high level of clinical malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(3):263-9.
6. Katsuragawa TH, Gil LH, Tada MS, Almeida e Silva A, Costa JD, Araújo MS, Escobar AL, Pereira-da-Silva LH. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon region of Brazil. PLoS One 2010;5(2):e9245.
7. Mungai M, Tegmeier G, Chamberland M, Parise M. Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999. N Engl J Med 2001; 344(26):1973-8.

8. Purdy E, Perry E; Gorlin J, Kathy. Transfusion-transmitted malaria: unpreventable by current donor exclusion guidelines? [letter] *Transfusion* 2004; 44:464.
9. Candolfi E. Transfusion transmitted malaria, preventive measures. *Transfusion Clinique et Biologique* 2005;12:107–13.
10. Freitas DRC, Simões BJ, Araújo WN. Avaliação do Sistema Nacional de Hemovigilância dos anos de 2002 a 2005. *Cad Saúde Colet* 2010;18(1):179-86.
11. Torres KL, Figueiredo DV, Zalis MG, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim W, Ferreira-da-Cruz MF. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. *Parasitol Res* 2006;98:519–24.
12. Fujikaha E, Fornazari PA, Penhalbel RSR, Lorenzetti A, Maroso RD, Amoras JT, Saraiva AS, Silva RU, Bonini-Domingos CR, Mattos LC, Rossit ARB, Cavasini CE, Machado RLD. Molecular screening of *Plasmodium* sp asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2007;49(1):1-4.
13. Batista-Dos-Santos S, Raiol M, Santos S, Cunha MG, Ribeiro-Dos-Santos A. Real-time PCR diagnosis of *Plasmodium vivax* among blood donors. *Malar J* 2012; 11:345.
14. Shehata N, Kohli M, Detsky A: The cost-effectiveness of screening blood donors for malaria by PCR. *Transfusion* 2004, 44:217-228.
15. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 57/2010. Diário Oficial da União 2010;16 dez.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.712/2013. Diário Oficial da União 2013;12 nov.
17. Freitas DRC, Gomes LT, Fontes CJ, Tauil PL, Pang LW, Duarte EC. Sensitivity of nested-PCR for *Plasmodium* detection in pooled whole blood samples and its usefulness to blood donor screening in endemic areas. *Transfus Apher Sci* 2014.doi:10.1016/j.transci.2014.01.016 [Epub ahead of print].
18. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN: High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61:315-320.
19. Echeverri D, Barreto DK, Osorio L, Cortés A, Martínez E. A case report of transfusion-transmitted *Plasmodium vivax* malaria from an asymptomatic donor to a premature newborn. *Biomedica* 2012;32 Suppl 1:8-12.
20. Haque U, Magalhães RJS, Mitra D, Kolivras KN, Schmidt WP, Haque R, Glass GE. The role of age, ethnicity and environmental factors in modulating malaria risk in Rajasthali, Bangladesh. *Malar J* 2011;10:367.

21. Haque U, Glass GE, Bomblies A, Hashizume M, Mitra D, Noman N, Haque W, Kabir MM, Yamamoto T, Overgaard HJ. Risk factors associated with clinical malaria episodes in Bangladesh: a longitudinal study. *Am J Trop Med Hyg* 2013;88(4):727–32.
22. Ferreira IM, Yokoo EM, Souza-Santos R, Galvão ND, Atanaka-Santos M. Factors associated with the incidence of malaria in settlement areas in the district of Juruena, Mato Grosso state, Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva* 2012;17(9):2415-24.
23. Oliveira AM, Mutemba R, Morgan J, Streat E, Roberts J, Menon M, Mabunda S. Prevalence of malaria among patients attending public health facilities in Maputo city, Mozambique. *Am J Trop Med Hyg* 2011;85(6):1002–7.
24. Tada MS, Ferreira RGM, Katsuragawa TH, Martha RCD, Costa JDN, Albrecht L, Wunderlich G, Pereira-da-Silva LH. Asymptomatic infection with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Brazilian Amazon basin: to treat or not to treat? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;107(5):621-9
25. Andrade BB, Santos CJN, Camargo LM, Souza-Neto SM, Reis-Filho A, Clarêncio J, Mendonça VRR, Luz NF, Camargo EP, Barral A, Silva AMM, Barral-Netto M. Hepatitis B Infection is associated with asymptomatic malaria in the Brazilian Amazon. *PLoS ONE* 2011;6(5):e19841.
26. Cerávolo IP, Bruña-Romero O, Braga EM, Fontes CJF, Brito CFA, Souza JM, Krettli AU, Adams JH, Carvalho LH. Anti-*Plasmodium vivax* Duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72(6):675–81.
27. Mahajan B, Zheng H, Pham PT, Sedegah MY, Majam VF, Akolkar N, Rios M, Ankrah I, Madjitey P, Amoah G et al. Polymerase chain reaction–based tests for pan-species and species-specific detection of human *Plasmodium* parasites. *Transfusion* 2012; 52:1949-1956.
28. Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, Druihe P, Laxminarayan R, Binka F, Kilama WL, Ford N, White NJ. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:564-573.

6.3. Artigo 3

Título

Avaliação normativa dos serviços de hemoterapia da região amazônica brasileira para prevenção da malária transmitida por transfusão.

Autores

Daniel Roberto Coradi de Freitas (1,2)

Elisabeth Carmen Duarte (1)

Afiliações

1. Núcleo de Medicina Tropical. Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, Brasil.

Resumo

Objetivo. Avaliar serviços de hemoterapia (SH) da Amazônia Legal nos componentes estrutura e processos com foco na prevenção da malária transmitida por transfusão.

Métodos. Trata-se de uma avaliação normativa, no contexto natural, baseada na Resolução de Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária nº 153/2004. Foram incluídos dez SH que foram classificados em “adequados” (>80-100 pontos); “parcialmente adequados” (>50-80); “inadequados” (<50). Foram avaliados os componentes “educação do doador” (5 pontos), “triagem clínica” (40 pontos), “triagem laboratorial” (40 pontos) e “hemovigilância” (15 pontos).

Resultados. A mediana geral dos pontos foi 49,8 (mínimo=16; máximo=78). Cinco SH foram classificados como “inadequados” e cinco como “parcialmente adequados”. A mediana da triagem clínica foi 26 pontos (mínimo=16; máximo=32). Os sete SH que avaliavam deslocamentos do doador utilizavam como critério de seleção o Índice Parasitário Anual (IPA) do município, do ano anterior ao vigente. A mediana da triagem laboratorial foi 20 pontos (mínimo=0; máximo=32). Oito SH realizavam testes laboratoriais para malária; seis testavam todas as doações. Sete utilizavam a gota espessa, mas apenas um realizava como preconizado pelo Ministério da Saúde. Um SH possuía programa de avaliação externa da qualidade para testes da malária. Na hemovigilância, dois SH relataram possuir procedimentos para detecção de casos de malária transfusional.

Conclusão. A malária é negligenciada como doença transmissível pelo sangue nos SH avaliados. Nenhum SH obteve classificação “adequada” tanto na classificação geral como nos componentes “triagem clínica” e “triagem laboratorial”. Maior atenção dos gestores dos SH, do Ministério da Saúde e da Vigilância Sanitária é necessária para que se cumpram os requisitos de segurança preconizados nas normas.

Palavras chave: avaliação em saúde – malária - serviços de hemoterapia - seleção de doador - segurança do sangue

Abstract

Objective. The aim of this study was to evaluate structure and processes of Blood Banks (BB) in the Brazilian Amazon Region for prevention transfusion-transmitted malaria (TTM).

Methods. It is a normative evaluation based on National Agency for Health Surveillance regulation n° 153/2004. We evaluated 10 BB and they were ranked as "adequate" (> 80-100 points); "partially adequate" (> 50-80); "inadequate" (<50). The components assessed were "donor education" (5 points) "donor interview" (40 points), "laboratory screening" (40 points) and "hemovigilance" (15 points).

Results. The overall median score was 49.8 (minimum=16, maximum=78). Five BB were ranked as "inadequate" and five as "partly adequate." The median of the "donor interview" component was 26 points (minimum=16, maximum=32) and "laboratory screening" was 20 points (minimum=0, maximum=32). Only one BB had a proficiency testing for malaria. Written instructions to detect TTM (hemovigilance proceedings) were confirmed to be implemented in only two BB.

Conclusion. The study showed that compliance to the regulation for prevention TTM is neglected. None of the BB evaluated was rated as "adequate". It is necessary that BB directors' and regulatory authorities make efforts to obligate blood establishments to compliance the regulatory requirements for prevention TTM.

Key-words: health evaluation; malaria; blood banks; donor selection; blood safety.

INTRODUÇÃO

A malária é endêmica na Amazônia Brasileira e a forma vetorial é a principal via de transmissão. Contudo, a malária transmitida por transfusão (MTT) é uma das mais importantes doenças parasitárias transmitidas pelo sangue e representa um risco importante para os pacientes das áreas endêmicas, pois os casos são usualmente muito graves^{1,2}. Nos Estados Unidos, onde não há malária endêmica, o número médio de casos de MTT notificado é de três casos por ano². No Brasil, o Sistema Nacional de Hemovigilância (SNH), criado em 2002³, registrou até hoje, um total de quatro casos de MTT, sendo três em 2006 e um em 2007; todos evoluíram para óbito. Estima-se que a prevalência de malária em doadores aptos, em áreas endêmicas brasileiras, utilizando testes de detecção de ácidos nucleicos (NAT) do *Plasmodium*, está entre 0,3% a 3%^{4,5,6}. Portanto, é provável que exista subnotificação de MTT no SNH.

No Brasil, a vigilância sanitária (VISA) atua no controle do risco e qualidade do sangue por intermédio de ações como normatização, inspeção sanitária, educação sanitária e hemovigilância. Essas ações são executadas pela VISA em nível federal, estadual e municipal, que integram o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária⁷. Os requisitos técnico-sanitários exigidos para os serviços de hemoterapia (SH) para prevenção da MTT estão definidos desde 1988, pela Lei 7.649/1988⁸, e outros atos infralegais – Decretos, portarias do Ministério da Saúde (MS) e Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

Em 1989, a Portaria MS n° 721/GM/1989⁹ passou a exigir a análise da história clínica e epidemiológica do doador para a malária incluindo histórico de infecções anteriores, sinais e sintomas recentes e deslocamentos para áreas endêmicas. Segundo o MS, a região amazônica é área endêmica para malária, a qual inclui os sete estados da região Norte e alguns municípios dos Estados de Mato Grosso e Maranhão, incluindo as capitais.

Após algumas atualizações normativas, duas alterações substanciais foram inseridas na RDC Anvisa n° 343/2002¹⁰, a saber: os SH das áreas endêmicas

devem utilizar o Índice Parasitário Anual (IPA) para exclusão de candidatos à doação expostos a áreas de alto risco (IPA>49,9 casos/1.000 habitantes) e devem executar testes laboratoriais nos doadores aptos. Todas as normas posteriores mantiveram tais obrigações.

Frente a esse cenário, o presente estudo apresenta uma avaliação normativa de SH selecionados da região amazônica brasileira tendo como objeto a prevenção da MTT. O objetivo é analisar a adesão desses SH às normas e padrões vigentes, descrever e discutir as práticas atuais desses estabelecimentos e recomendar medidas para melhoria da prevenção da MTT.

MÉTODO

O presente estudo é uma pesquisa avaliativa normativa, com enfoque na avaliação para a gestão¹¹. Segundo Contandriopoulos *et al.* (1997)¹², avaliar é fazer um julgamento de valor sobre uma intervenção ou sobre seus componentes para ajudar na tomada de decisões. Este julgamento pode ser baseado na aplicação de critérios e de normas e, neste caso, é chamada de avaliação normativa, definida como a atividade de fazer um julgamento, comparando a organização (estrutura), os procedimentos ou métodos desenvolvidos (processo), os recursos empregados e os resultados obtidos, com os requisitos e critérios estabelecidos em normas. Trata-se de uma atividade científica que requer para sua execução determinado rigor metodológico¹³.

Esta pesquisa utilizou avaliadores externos e o contexto da avaliação foi o natural (sem intervenções)¹². O juízo formulado se baseou na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) n° 153/2004¹⁴ (RDC 153/2004), vigente à época, para o tema prevenção da MTT. Os componentes trabalhados na avaliação foram estrutura e processo¹⁵.

A coleta de dados ocorreu de Janeiro de 2009 a Junho de 2011. Foram avaliados todos os nove hemocentros coordenadores da região amazônica brasileira e um núcleo de hemoterapia. Para a coleta de dados, utilizou-se

roteiro padronizado semiestruturado, preenchido por meio de entrevista com o responsável técnico do SH e/ou responsável pelo setores/atividades avaliados (educação do doador, triagem clínica, triagem sorológica, hemovigilância). O roteiro foi aplicado por um único pesquisador, experiente na aplicação de roteiros de inspeção e em entrevista epidemiológica. Para complementar o roteiro, foram avaliados materiais educativos para os candidatos à doação e as instruções escritas (procedimentos operacionais) para as rotinas de trabalho relacionados ao controle da MTT.

Os SH foram categorizados em adequado, parcialmente adequado ou inadequado (quadro 1), conforme a pontuação obtida. Para a definição dos pesos de cada atividade e item, utilizou-se o conceito de risco potencial¹⁶, tido como a “possibilidade de ocorrência de um agravo à saúde, sem necessariamente descrever o agravo e sua probabilidade de ocorrência. É um conceito que expressa o juízo de valor sobre exposição em potencial a um possível risco”. Diferentemente do risco epidemiológico que pode ser medido e calculado, o risco potencial é construído, muitas vezes, da percepção acumulativa de especialistas sobre os erros ou falhas de determinado produto, processo e serviço ao longo da história¹⁶. Portanto, os critérios para pontuação foram baseados na avaliação dos autores sobre o risco potencial de ocorrência de casos de MTT pelo não cumprimento de cada item da norma. Foram considerados como críticos para a ocorrência de MTT as atividades da triagem clínica e da triagem laboratorial. Os detalhes da pontuação e de cada item avaliado estão apresentados no quadro 2. Destaca-se que, embora tais critérios estejam fundamentados na RDC 153/2004, o texto final de cada item avaliado evidencia o foco específico no controle de risco para MTT. Portanto, não se trata de uma descrição literal do texto da RDC 153/2004.

O modelo ideal com as melhores práticas para a máxima redução do risco de MTT, segundo a RDC 153/2004, é apresentado na figura 1. Neste modelo, as quatro atividades envolvidas na prevenção da MTT são apresentadas nos componentes estruturas, processos e resultados.

O estudo foi aprovado nos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller da Universidade Federal de Mato Grosso e da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Quadro 1 – Descrição do modelo de classificação do serviço de hemoterapia e de seus setores/atividades segundo a pontuação obtida após a avaliação.

Setor/Atividade	Peso	Nº itens	Faixa pontos	Classificação
			0	Inadequado
Educação do doador	0,5	1	5	Adequado
			0 – 20	Inadequado
Triagem Clínica	4	10	> 20 - 32	Parcialmente adequado
			> 32 – 40	Adequado
			0 – 20	Inadequado
Triagem Laboratorial	4	5	> 20 - 32	Parcialmente adequado
			> 32 – 40	Adequado
			0	Inadequado
Hemovigilância	1,5	2	7,5	Parcialmente adequado
			15	Adequado
			0 – 50	Inadequado
Classificação Final	-	18	> 50 – 80	Parcialmente adequado
			> 80 - 100	Adequado

Quadro 2 – Detalhamento dos critérios verificados para cada setor e atividade dos serviços de hemoterapia, sua pontuação e o item da RDC 153 que se utilizou para fundamentar a exigência.

Setor/atividade	Item avaliado	Pontos	Item da RDC 153/2004
Educação do doador	Disponibilizar material educativo ao doador com informações sobre MTT	10,0	B.4
Triagem Clínica	Realizar entrevista individual com o doador em ambiente privativo	1,0	B.2 e B.5
	Possuir POP para a triagem clínica com os critérios de exclusão para malária	1,0	A.11, B.5.2.6.2 e P.1
	Utilizar critério de exclusão <u>deslocamentos para área de risco</u> , ou seja, rejeitar o candidato procedente de área com IPA>49,9	1,0	B.5.2.6.2
	Utilizar critério de exclusão <u>residência em área de risco</u> , ou seja, rejeitar o candidato com residência em área com IPA>49,9	1,0	B.5.2.6.2
	Utilizar critério de exclusão <u>antecedentes de malária</u> , ou seja: a) Rejeitar candidatos com história de malária nos 12 meses que antecedem a doação b) Rejeitar candidatos com febre nos últimos 30 dias c) Rejeitar candidatos com suspeita de malária nos últimos 30 dias	Nenhum = 0 1-2 = 0,5 3 = 1,0	B.5.2.6.2
	Possuir programa de treinamento para triagem clínica para malária	1,0	P.2
	Possuir na ficha de triagem (questionário) padronizada a avaliação dos <u>deslocamentos para área de risco</u>	1,0	A.12, B.5.2.6.2 e B.6.4
	Possuir na ficha de triagem (questionário) padronizada a avaliação sobre <u>residência em área de risco</u>	1,0	A.12, B.5.2.6.2 e B.6.4
	Possuir na ficha de triagem (questionário) padronizada a avaliação dos <u>antecedentes de malária</u> . - malária nos 12 meses que antecedem a doação - febre nos últimos 30 dias - suspeita de malária nos últimos 30 dias	Nenhum = 0 1-2 = 0,5 3 = 1,0	A.12, B.5.2.6.2 e B.6.4
Possuir mecanismo de alerta que impeça a doação por candidatos à doação inaptos malária, conforme critérios utilizados pelo SH	1,0	N.3 e N.6.f	
Triagem Laboratorial	Realizar triagem laboratorial em todos os doadores, segundo a RDC 153: realizar teste parasitológico em todos os doadores que residam ou tenham se deslocado para áreas de IPA médio ou baixo (IPA< 50)	4,0	B.5.2.6.2
	Possuir POP o preparo do teste segundo as referências abaixo: - Se gota espessa, deve seguir o Manual de Diagnóstico de Malária/MS - Se teste imunoenzimático, seguir o manual do fabricante	2,0	A.11 e P.1
	Possuir programa de treinamento para a realização dos testes laboratoriais	1,0	P.2

	Possuir POP para execução do teste segundo as referências abaixo: - Se gota espessa, o Manual de Diagnóstico de Malária/MS recomenda que um resultado negativo deva ser dado após leitura de, no mínimo, 200 campos - Se teste imunoenzimático, realizar segundo o fabricante	2,0	A.11 e P.1
	Possuir AEQ para o teste de malária	1,0	A.14
Hemovigilância	Possuir procedimentos para detectar doadores que se tornaram casos suspeitos ou confirmados de malária após a doação	5,0	A.10
	Possuir procedimentos para detectar receptores com suspeita de MTT de hemocomponentes produzidos no SH	5,0	A.11 e A.17

MTT: malária transmitida por transfusão; POP: procedimento operacional padrão ou qualquer instrução escrita; SH: Serviços de Hemoterapia; MS: Ministério da Saúde; AEQ: Avaliação Externa da Qualidade ou teste de proficiência.

Figura 1: Modelo ideal com a descrição das melhores práticas para a máxima redução do risco de malária transmitida por transfusão (MTT) segundo a RDC Anvisa nº 153/2004.



RESULTADOS

A mediana da pontuação final para o conjunto dos SH foi de 49,8 (mínimo=16; máximo=78) (tabela 1). Nenhum SH foi considerado “Adequado”; cinco foram classificados como “Parcialmente Adequados” e cinco como “Inadequados”. A tabela 2 apresenta os resultados detalhados dos componentes e itens que foram avaliados para a pontuação final dos SH.

No componente educação do doador observou-se que todos os SH utilizavam apenas panfletos e cartazes para informar os candidatos à doação sobre as doenças transmissíveis pelo sangue. A malária estava citada em panfletos de apenas 2/10 dos SH avaliados (tabela 2). Em dois SH foram encontrados quatro tipos de panfletos produzidos pelo MS, mas nenhum abordava os riscos de MTT.

Na triagem clínica, seis SH foram considerados parcialmente adequados e quatro inadequados (Tabela 1). Cinco SH possuíam procedimentos escritos para triagem clínica da malária e apenas um apresentou na sua ficha de triagem padronizada todos os itens previstos na norma para avaliação dos antecedentes de malária (febre, suspeita de malária e doente de malária) (tabela 2).

Sete SH utilizavam critérios de exclusão por exposição a áreas de risco (tabela 2) e todos utilizavam o município como área de alto risco. Um SH ainda se baseava no IPA da localidade quando se referia à capital do Estado. Quanto ao tempo de inaptidão para candidatos à doação com deslocamentos para áreas de alto risco, foram identificados quatro tempos diferentes, a saber (em dias): 7 (1/7); 15 (1/7); 30 (2/7) e 180 (3/7). Para 6/10 SH, a Vigilância Epidemiológica fornecia o IPA e 1/10 SH acessava diretamente o SIVEP-Malária. Todos usavam o IPA do ano anterior para definir áreas de alto risco do ano corrente.

Para os critérios de exclusão por antecedentes de malária, apenas o SH-I não aplicava nenhum dos critérios previstos na norma e 3/10 aplicavam todos os critérios exigidos (SH-B, F e G) (tabela 2). Destaca-se que 9/10 SH aplicavam o critério “doente de malária nos últimos 12 meses”, 7/10 aplicavam “febre nos

últimos 30 dias” e 3/10 aplicavam “suspeita de malária nos últimos 30 dias”. Dois SH utilizavam esses dois últimos critérios considerando um período de 15 dias. Foram citados ainda os critérios “ter tomado (ou estar tomando) medicamento para malária” (2/10) e “ter alguém doente de malária em casa” (2/10).

A análise da ficha de triagem demonstrou que apenas o SH-G tinha questões na ficha para os três critérios de exclusão por antecedentes de malária, enquanto dois SH (I e J) não tinham nenhuma pergunta para esse critério (tabela 2). Uma grande variabilidade foi observada nas perguntas da ficha de triagem sobre deslocamentos e residência em áreas de alto risco, a saber: 1) “Esteve em área de alto risco para malária?”; 2) “Esteve em área de alto risco para malária? Aonde? Há quanto tempo?”; 3) “Viajou para algum município dentro do estado? Quando e qual?”; 4) “Nos últimos 6 meses viajou para algum local? Se sim, onde?”; 5) “É procedente de zona endêmica de malária?”; 6) “Esteve em região endêmica de malária nos últimos 30 dias?”; 7) “Reside em área de alto risco para malária?”; 8) “Reside em área de alto risco para malária? Aonde? Há quanto tempo?”. Exceto para as perguntas 3 e 4, é possível interpretar que a responsabilidade por indicar a exposição às áreas de risco cabia ao doador.

Na avaliação da triagem laboratorial para malária, quatro SH foram classificados como parcialmente adequados e sete como inadequados (Tabela 1). Apenas 6/10 realizavam triagem laboratorial em todas as doações conforme a norma preconiza (Tabela 2). Dois SH testavam doadores apenas com exposição a áreas com IPA entre 10,0 e 49,9 lâminas positivas por 1.000 habitantes (médio risco) e outros dois não realizavam nenhum teste, argumentando não pertencerem à área endêmica. Sete SH utilizavam na triagem laboratorial a gota espessa e um utilizava teste imunocromatográfico. Em relação às instruções escritas para execução dos testes laboratoriais (gota espessa ou imunocromatográfico), dois SH (B e G) foram considerados com instruções adequadas. Um deles executava gota espessa e adequadamente

alertava que 200 campos deveriam ser avaliados para liberar laudo negativo, conforme preconiza o Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária do MS¹⁷. Se considerados os oito SH que realizavam algum teste laboratorial para malária (adequado ou não às normas), seis relataram não ter identificado testes positivos nos últimos 5 anos. Além disso, apenas o SH-B relatou possuir um programa de avaliação externa da qualidade (AEQ) para o teste de malária (Tabela 2). Contudo, todos os SH avaliados possuíam AEQ para os outros testes da triagem laboratorial e para imunematologia.

No componente hemovigilância, uma experiência inovadora encontrada foi a inclusão no informativo “Cuidados pós-doação”, entregue a cada doador, do texto: “Fui orientado que se apresentar malária/dengue e/ou febre nos próximos ___ dias após a doação, devo informar ao Hemocentro _____ pelo telefone _____”.

Dois SH relataram que já detectaram casos de MTT de hemocomponentes produzidos por eles e todos os casos detectados evoluíram para óbito.

Tabela 1: Pontuação final obtida em cada setor/atividade e a classificação dos dez serviços de hemoterapia de acordo com os critérios estabelecidos nesta avaliação.

Setor/atividade	Pontuação ponderada por serviços de hemoterapia										Mediana
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
Educação	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0
Classificação	I	A	I	I	I	I	I	A	I	I	
Triagem Clínica	28,0	26,0	24,0	20,0	16,0	26,0	32,0	32,0	16,0	30,0	26,0
Classificação	PA	PA	PA	I	I	PA	I	PA	I	PA	
Triagem Laboratorial	20,0	32,0	0,0	28,0	28,0	28,0	8,0	20,0	0,0	8,0	20,0
Classificação	I	PA	I	PA	PA	PA	I	I	I	I	
Hemovigilância	0,0	15,0	0,0	0,0	7,5	0,0	0,0	0,0	0,0	7,5	0,0
Classificação	I	A	I	I	PA	I	I	I	I	PA	
Pontuação máxima	100	100	100	100	100	100	100	100	100	88,0*	-
Pontuação obtida	48,0	78,0	24,0	48,0	51,5	54,0	40,0	57,0	16,0	51,7	49,8
Classificação final	I	PA	I	I	PA	PA	I	PA	I	PA	

I = Inadequada; PA = Parcialmente adequada; A = Adequada

* dois itens não foram avaliados na triagem laboratorial por serem atividades terceirizadas.

Tabela 2: Pontuação obtida em cada item avaliado nos dez serviços de hemoterapia pesquisados (A até J) da Região Amazônica Brasileira.

Setor/atividade	Item avaliado	Serviços de hemoterapia										N*
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
Educação do doador	Disponibilizar material educativo ao doador com informações sobre MTT	0,0	10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10	0,0	0,0	2
	Subtotal	0,0	10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10	0,0	0,0	
Triagem Clínica	Realizar entrevista individual com o doador em ambiente privativo.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	10
	Possuir POP para a triagem clínica com critérios de exclusão para malária	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	5
	Utilizar critério de exclusão <u>deslocamentos para área de alto risco</u>	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	7
	Utilizar critério de exclusão <u>residência em área de alto risco</u>	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0	1,0	5
	Utilizar critério de exclusão <u>antecedentes de malária</u>	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5	0,0	0,5	3
	Possuir programa de treinamento para a triagem clínica para malária	1,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	6
	Possuir na ficha de triagem (questionário) a avaliação dos <u>deslocamentos para área de alto risco</u> .	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	8
	Possuir na ficha de triagem (questionário) a avaliação sobre <u>residência em área de alto risco</u> .	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	2
	Possuir na ficha de triagem (questionário) a avaliação dos <u>antecedentes de malária</u> .	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	0,0	0,0	1
	Possuir mecanismo de alerta que impeça a doação por candidatos à doação inaptos por malária, conforme os critérios do SH	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	9
	Subtotal	7,0	6,5	6,0	5,0	4,0	6,5	8,0	8,0	4,0	7,5	
Triagem Laboratorial	Realizar a triagem laboratorial em todos os doadores	4,0	4,0	0,0	4,0	4,0	4,0	0,0	4,0	0,0	0,0	6

	Possuir POP para o preparo do teste segundo as referências abaixo: - Se gota espessa, seguir o Manual de Diagnóstico de Malária/MS - Se teste imunoenzimático, seguir o fabricante	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	2,0	4
	Possuir programa de treinamento para a realização dos testes	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	0,0	**	6
	Possuir POP para execução do teste segundo as referências abaixo: - Se gota espessa, o Manual de Diagnóstico de Malária/MS recomenda que um resultado negativo deva ser dado após leitura de, no mínimo, 200 campos. - Se teste imunoenzimático, seguir o fabricante.	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	**	2
	Possuir AEQ para o teste de malária.	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1
	Subtotal	5,0	8,0	0,0	7,0	7,0	7,0	2,0	5,0	0,0	2,0	
Hemovigilância	Possuir POP para detectar doadores que se tornaram casos suspeitos ou confirmados de malária após a doação	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2
	Possuir procedimentos para detectar receptores com suspeita de MTT de componentes produzidos no SH	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	2
	Subtotal	0,0	10	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	

MTT: malária transmitida por transfusão; POP: procedimento operacional padrão ou qualquer instrução escrita; SH: Serviços de Hemoterapia; MS: Ministério da Saúde; AEQ: Avaliação Externa da Qualidade ou teste de proficiência.

* Número de serviços de hemoterapia que atenderam corretamente ao item.

** Não avaliados por tratar-se de atividade terceirizada.

DISCUSSÃO

São raras publicações sobre avaliação de SH brasileiros e, quando encontradas, tratam da satisfação de doadores¹⁸, de desempenho de testes sorológicos¹⁹ ou de custos²⁰. Este é o primeiro estudo brasileiro que avalia a qualidade dos procedimentos e métodos utilizados na prevenção da MTT nos SH.

O desempenho geral mostra que a adesão à RDC 153/2004 para a prevenção da MTT é negligenciada pelos SH avaliados. No sistema de pontuação proposto, apenas um estabelecimento obteve mais que 60 pontos.

A educação do doador é um importante fator para redução da inaptidão sorológica e da transmissão de doenças por transfusão²¹. Apesar dos SH avaliados apresentarem iniciativas para educação do doador utilizando panfletos, a maioria desses não se referiam a MTT, reforçando que a malária é usualmente negligenciada como risco ao paciente. Além disso, panfletos para educação do doador parecem ter baixa efetividade. Um estudo mostrou que panfletos educativos tiveram ação limitada quando utilizados isoladamente para reduzir inaptidão sorológica por HIV²². Portanto, outras abordagens educativas devem ser incentivadas.

A triagem clínica foi também identificada como ponto frágil. Esta etapa é o primeiro passo para a garantia de sangue seguro e deve ser executada por pessoal treinado e competente, com questionário pré-definido, validado e uniforme²³. A importância da triagem clínica é ainda maior para prevenção da MTT, pois os testes da triagem laboratorial utilizados não possuem alta sensibilidade²⁴. A variabilidade das perguntas dos questionários de triagem mostra que não há padronização entre os SH avaliados para abordagem do doador em relação à malária. Estudos para validação de perguntas aos candidatos à doação para prevenir a MTT devem ser realizados.

Sobre os critérios de seleção do doador por exposição a áreas de risco, parece claro que as normas técnicas precisam de aperfeiçoamentos. Em 1999, Kiesslich *et al.*²⁵ propuseram que as faixas de risco do IPA fossem utilizadas

como critério para avaliação de risco do doador. As normas técnicas adotaram este método. Contudo, as faixas de risco do IPA não foram criadas ou padronizadas para este fim. Não há na literatura dados epidemiológicos que permitam estabelecer, *a priori*, faixas do IPA para triagem de candidatos à doação e a sua utilização deve ser reavaliada. Sugere-se a realização de painéis de especialistas para definir a utilidade do IPA como parâmetro para seleção de doadores. Enquanto isso, é essencial que os SH tenham acesso ao dado mensal do IPA para que a triagem clínica seja realizada com base em informações atualizadas e não do ano anterior, como faziam os SH pesquisados.

A triagem laboratorial para malária apresentou deficiências relevantes como a não execução de testes em todas as doações, a ausência de AEQ para os testes de malária e, no caso do teste gota espessa, o uso de técnica inadequada (insuficiente) de leitura para concluir um resultado negativo.

A gota espessa tem sensibilidade limitada para detecção de infecções assintomáticas com baixa parasitemia²⁴. Portanto, a sua execução deve ser muito cautelosa para reduzir ao máximo os resultados falsamente negativos. O MS possui, desde 2001, um programa de AEQ gratuito para SH públicos que inclui provas sorológicas e imunoematológicas. Contudo, a malária nunca foi incluída no programa e sua inclusão para o teste da gota espessa mostra-se relevante.

A triagem da malária nos SH é um desafio mundial. Nos países indenes, em geral, opta-se pela exclusão temporária de candidatos à doação que se deslocaram para regiões endêmicas e testes laboratoriais não são executados. Nos países endêmicos não há consenso das melhores práticas para prevenir a MTT. Alguns países com áreas endêmicas, como Colômbia²⁶ e Etiópia²⁷, não utilizam triagem laboratorial universal e fazem a avaliação do risco e seleção baseada exclusivamente no questionário epidemiológico. Na Turquia²⁸, ocorre a seleção por meio de questionário e, caso haja inaptidão do doador, testes sorológicos e moleculares podem ser utilizados para reduzir o tempo de inaptidão, conforme preconizado nos guias europeus. Nesse sentido,

recomenda-se uma avaliação sobre a possibilidade de municípios ou microrregiões onde, há muito tempo, não se registram casos autóctones de malária, utilizar os mesmos critérios de seleção dos municípios das áreas endêmicas. Essa mudança reduziria custos da triagem laboratorial da malária, mas com possível aumento da inaptidão clínica.

Considerando as limitações da gota espessa como teste de triagem em SH, aliada à possibilidade de reduzir o número de SH obrigados a realizar triagem laboratorial para malária, sugere-se avaliar o custo-efetividade da implantação do NAT para plasmódios nos SH dos municípios ou microrregiões endêmicas.

As fragilidades apontadas no processo de seleção e identificação de candidatos à doação sob risco de transmitir malária pelo sangue apontam para a importância de um sistema de hemovigilância sensível e estruturado. É importante que o doador informe ao SH que ele se tornou um caso ou está com suspeita de malária após a doação. Esta proatividade do doador depende do conhecimento de que a malária é transmitida por transfusão e de canais de comunicação resolutivos com o SH. A inclusão na Ficha de Notificação SIVEP-Malária de um campo com a pergunta “Você doou sangue nos últimos 30 dias?”, juntamente com o estabelecimento de fluxo de informação entre a Unidade Notificante e o SH, poderiam identificar doações realizadas durante o período de incubação da doença, reduzindo casos de MTT ou permitindo a identificação e tratamento oportuno de MTT, reduzindo sua letalidade. Contudo, os portadores assintomáticos de infecção pelo *Plasmodium* ainda são um desafio para os SH e a hemovigilância torna-se um pilar essencial para identificação precoce dos casos de MTT.

Este estudo apresenta algumas limitações metodológicas que merecem ser observadas. O desenho do estudo é transversal e a situação analisada pode ter se modificado após a pesquisa, inclusive em consequência à própria intervenção promovida pelo estudo. Além disso, a avaliação se utilizou de uma norma que, no decorrer do estudo, foi revogada. Porém, as alterações nas novas normas (RDC Anvisa nº 57/2010 e Portaria MS nº 2.712/2013) no que se refere à triagem de doadores para malária nas áreas endêmicas foram

mínimas, como i) a definição de município como área de avaliação do IPA onde o doador esteve ou reside; ii) definição dos tempos de inaptidão por deslocamentos para áreas de alto risco; iii) permissão do uso de testes laboratoriais de detecção de antígenos plasmodiais. Estas alterações não alteram a pontuação e classificação obtida neste estudo. Ressalta-se ainda que todas as informações foram autorreferidas e as respostas eram confirmadas, sempre que possível, por documentos. Mas, por tratar-se de avaliação externa, apesar da concordância do responsável legal do estabelecimento em participar da pesquisa, algumas vezes não foi permitido o acesso às instruções escritas e, nestes casos, não foram adotadas medidas para confirmação das respostas por mais de um meio de verificação. Essa situação, porém, foi rara (n=2). Como regra, se recorreu ao responsável pelo setor para obter as respostas mais precisas sobre a prática. Na sua ausência, foi o responsável técnico pelo SH que respondeu o questionário (n=1). Portanto, erros de aferição podem, eventualmente, ter ocorrido. Quanto à pontuação, ressalta-se que o peso utilizado para cada questão foi decidido pelos pesquisadores, baseado em critérios arbitrários sobre a relevância da questão para o risco potencial de ocorrência de MTT. Outros sistemas de pontuação poderiam gerar resultados distintos na classificação final. Todavia, a validação desses sistemas de pontuação e classificação é limitada pelo número pequeno de eventos.

Apesar destas limitações, considera-se que os resultados e o modelo lógico proposto cumprem seus objetivos de avaliar a estrutura e os processos dos SH e podem ser utilizados para avaliações internas e correções de atividades, bem como pela VISA para apoiar suas ações, principalmente as inspeções.

Por fim, como reforço à relevância dessa temática, destaca-se que, em 2004, a OMS lançou o Desafio Global para a Segurança do Paciente, que incluiu “sangue seguro” como um dos seus pilares. Para isso, exige-se a implantação de programas que garantam sangue com alta qualidade, seguro e acessível a todos que realmente necessitarem²⁹. A seleção dos doadores e a hemovigilância são elementos estruturantes desse processo. Qualquer transmissão de doença é considerada uma falha e as melhores práticas devem

ser adotadas para que o sangue não cause dano ao paciente, o que inclui os cuidados para prevenção da MTT.

CONCLUSÃO

O estudo traz evidências de que a adesão às normas para a prevenção da MTT era negligenciada pelos SH avaliados. Nenhum SH obteve classificação “adequada” tanto na classificação geral como nos componentes de triagem clínica e triagem laboratorial. Maior atenção dos gestores destes SH, do MS e da VISA é necessária para que se cumpram os requisitos de segurança preconizados nas normas, em especial a elaboração e o cumprimento de instruções escritas para a triagem clínica e laboratorial da malária, a inclusão de uma AEQ para detecção de malária e implementação do sistema de hemovigilância. Por outro lado, acredita-se que essas normas, mesmo após as revisões de 2010 e 2011, podem ainda ser aperfeiçoadas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e Anvisa pelo financiamento deste estudo. Aos SH participantes por permitirem o acesso aos dados dos doadores e às instalações.

REFERÊNCIAS

1. Mungai M, Tegtmeier G, Chamberland M, Parise M. Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999. *N Engl J Med* 2001; 344:1973-8.
2. Purdy E, Perry E; Gorlin J, Kathy. Transfusion-transmitted malaria: unpreventable by current donor exclusion guidelines? [letter] *Transfusion* 2004; 44:464.
3. Freitas DRC, Simões BJ, Araújo WN. Avaliação do Sistema Nacional de Hemovigilância dos anos de 2002 a 2005. *Cad Saúde Colet* 2010; 18:8.

4. Batista-Dos-Santos S, Raiol M, Santos S, Cunha MG, Ribeiro-Dos-Santos A. Real-time PCR diagnosis of *Plasmodium vivax* among blood donors. *Malar J* 2012; 11:345.
5. Fugikaha E, Fornazari PA, Penhalbel RS, Lorenzetti A, Maroso RD, Amoras JT et al. Molecular screening of *Plasmodium* sp. asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007; 49:1-4.
6. Torres KL, Figueiredo DV, Zalis MG, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim W, Ferreira-da-Cruz MF. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. *Parasitol Res* 2006;98:519–24.
7. Mota DM, Freitas DRC, Araújo WN. Evaluation of the System of Sanitary Vigilance of Blood at the federal level, Brazil, 2007. *Cien Saude Colet* 2012; 17:191-202.
8. Brasil. Lei Federal nº 7.649/1988. *Diário Oficial da União* 1988; 27 jan.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria GM nº 721/1989. *Diário Oficial da União* 1989; 11 ago.
10. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 343/2002. *Diário Oficial da União* 2002; 13 dez.
11. Novaes HM. Evaluation of health programs, services and technologies. *Rev Saude Publica* 2000; 34:547-9.
12. Contandriopoulos AP, Champagne F, Denis JL, Pineault R. Avaliação na área da saúde: conceitos e métodos. In: Hartz ZMA (org.). *Avaliação em Saúde: dos Modelos conceituais à prática na análise da implantação de programas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1997. p.29-47.
13. Uchimura KY, Bosi MLM. Quality and subjectivity in the evaluation of health services and programs. *Cad Saúde Pública* 2002, 18; 1561-9.
14. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 153/2004. *Diário Oficial da União* 2004; 14 jun.
15. Donabedian A. The quality of care. How can it be assessed? *JAMA* 1988; 260:1743-8.
16. Leite HJD, Navarro MVT. Risco potencial: um conceito de risco operativo para vigilância sanitária. Costa, EA. (org). *Vigilância Sanitária: temas para debate* [online]. Salvador: EDUFBA; 2009. 237 p.61-68.
17. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de diagnóstico laboratorial da malária*. Brasília: Ministério da Saúde:1999.
18. Di Colli L, Bassi LL, Omotto CA, Rehme LHM, Matsuo T. O papel do usuário na organização do setor de coleta de sangue do Hemonúcleo de Apucarana, Paraná, Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2009; 31:98-103.

19. Saéz-Alquézar A, Otani MM, Sabino EC, Ribeiro-dos-Santos G, Salles N, Chamone DF. Evaluation of the performance of Brazilian blood banks in testing for Chagas' disease. *Vox Sang* 1998; 74: 228-31.
20. Ubiali EMA, Sampaio DA, Pinho PF, Covas DT. Custo médio do Módulo de Coleta de sangue total pelo método ABC. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008; 30:213-7.
21. Ramezani H, Bozorgi SH, Nooranipour M, Sadri M, Molaverdikhani S, Alavian SM. Successful exclusion of blood-borne viral disease in blood donors. *Eur J Intern Med* 2011; 22:71-4.
22. Gonçalves TT, Sabino EC, Salles NA, Almeida-Neto C, Mendrone-Jr A, Dorlhiac-Laccer PE et al. The impact of simple donor education on donor behavioral deferral and infectious disease rates in São Paulo, Brazil. *Transfusion* 2010; 50:909-17.
23. Orton SL, Virvos VJ, Williams AE. Validation of selected donor-screening questions: structure, content, and comprehension. *Transfusion* 2000; 40:1407-13.
24. Grande R, Petrini G, Silvani I, Simoneschi B, Marconi M, Torresani E. Immunological testing for malaria and blood donor deferral: the experience of the Ca' Granda Polyclinic Hospital in Milan. *Blood Transfus* 2011; 9:162-6.
25. Kiesslich D, Araújo MA, Yurtsever SV, Torres K. Controle da malária pós-transfusional na Amazônia Brasileira: proposta de modificação das normas técnicas. *Informe Epidemiológico do SUS* 1999; 8:53-57.
26. Castillo C, Ramírez C. Tamización de malária en donantes sangre de Cali, Colombia. *Biomédica* 2005; 25:203-10.
27. Gelaw B, Mengistu Y. The prevalence of HBV, HCV and malaria parasites among blood donors in Amhara and Tigray regional states. *Ethiop J Health Dev* 2007; 22:3-7.
28. Değirmenci A, Döşkaya M, Caner A, Nergis S, Gül K, Aydınok Y et al. Action plan to regain unnecessary deferred blood donors due to malaria risk in Turkey. *Transfus Apher Sci* 2012; 46:269-75.
29. Pittet D, Donaldson L. Clean care is safer care: the first global challenge of the WHO World Alliance for Patient Safety. [special report]. *Am J Infect Control* 2005; 33:476-9.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

O sangue e seus componentes são produtos biológicos essenciais para o suporte à vida e tratamento de milhões de pacientes no mundo, seja nas urgências médicas ou na manutenção da vida de portadores de doenças crônicas. A OMS tem buscado esforços para que os Estados Membros incluam o sangue na lista de produtos médicos essenciais (International Regulatory Harmonization, 2012).

Apesar da sua utilidade, ser transfundido representa risco de transmissão de doenças aos pacientes, risco este cada vez mais reduzido (Seed *et al.*, 2005). Pelo menos dois fatores contribuíram para a redução do risco de doenças transmitidas pela transfusão de hemocomponentes: a) redução da janela imunológica³ após a incorporação dos NAT; b) redução de erros humanos após a incorporação das ferramentas voltadas à gestão da qualidade, com o desenvolvimento e implantação das boas práticas de produção, com se tem feito na indústria farmacêutica.

Apesar de o NAT já ser muito utilizado em diversos países para a detecção viral, o uso desta técnica na triagem de doadores de sangue para as doenças parasitárias ainda é muito pouco utilizado no mundo.

Dentre as doenças parasitárias transmitidas por transfusão, a malária merece destaque pela alta incidência na população geral em vários países do mundo e pela gravidade quando transmitida por transfusão.

A triagem de doadores para a malária é um desafio. Nos países indenes, a aplicação de critérios muito sensíveis e pouco específicos gera inaptidão desnecessária de candidatos à doação, com perdas econômicas importantes.

Nos países endêmicos ou com áreas endêmicas para malária, esse quadro é

³ Usa-se o termo janela imunológica tanto para o período entre a infecção e a detecção de anticorpos contra o agente infeccioso como para o período entre a infecção e a detecção de qualquer antígeno ou material genético (DNA ou RNA) do agente.

ainda mais grave. É necessário que haja um equilíbrio entre a alta sensibilidade dos métodos de seleção de candidatos à doação, e a manutenção do estoque do produto, que deve ser garantida pela alta especificidade destes métodos.

Este estudo confirmou a existência de doadores aptos positivos para malária em SH da Região Amazônica brasileira e mostrou que, utilizando um NAT como padrão-ouro, os critérios utilizados nas triagens clínica, epidemiológica e laboratorial (teste da gota espessa) dos doadores não foram capazes de excluir o doador infectado pelo *Plasmodium* (ou seja, apresentaram sensibilidade insuficiente) (artigo 2).

Este estudo demonstrou também, que a alta sensibilidade alcançada pela *nested PCR* em *pool* de até quatro amostras de sangue total (Artigo 1), sugere que o NAT em *pool* de amostras pode ser uma alternativa para se aumentar a sensibilidade, em comparação à gota espessa, da triagem laboratorial de doadores de sangue para a malária e reduzir os custos do uso desta tecnologia.

Além disso, no presente estudo, todos os candidatos à doação que foram impedidos de doar pela triagem clínica e epidemiológica para a malária foram negativos na *nested PCR*, apontando a baixa especificidade desta triagem (Artigo 2). Em especial, a alta prevalência, entre os candidatos à doação, de fatores de risco para a malária, tanto para os fatores previstos na legislação como para os fatores apontados pela literatura científica, faz com que a triagem epidemiológica tenha muito pouca especificidade. Foi demonstrado que, se aplicada com rigidez pelos SH, a triagem epidemiológica levaria a uma classificação de inaptidão excessiva e desnecessária, contribuindo com provável desabastecimento de sangue na região.

Em relação à aplicação dos requisitos normativos para a prevenção da MTT, os resultados do estudo (Artigo 3) sugerem que a sua implantação é elementar nos SH avaliados. Nenhum dos SH atendia plenamente os requisitos regulatórios de segurança para prevenção da MTT nas triagens clínica e laboratorial. Vale lembrar que os requisitos avaliados estavam vigentes desde 2002, o que demonstra negligência dos SH com o tema. O estudo ainda aponta

que na última norma publicada pelo Ministério da Saúde (Portaria 2.712/2013) alguns requisitos regulatórios precisam de melhor discussão. São exemplos disso: a permissão que a norma traz para o uso de testes laboratoriais para a detecção do *Plasmodium* sem o devido registro na Anvisa, além de sua baixa sensibilidade; a manutenção do uso do IPA como critério de risco para seleção de doadores (sendo esse indicador de utilidade limitada para essa finalidade) e o conceito vago de município com transmissão ativa.

Em vista dos resultados que foram obtidos e discutidos nesta tese, as seguintes recomendações para reduzir o risco de MTT e sua letalidade na Região Amazônica brasileira devem ser consideradas para debates futuros:

- Incluir entre os critérios de seleção de doadores para a malária na Região Amazônica brasileira o uso de testes laboratoriais com alta sensibilidade e especificidade, com ênfase nos NAT;
- Realizar estudos de custo-efetividade para implantação de NAT na triagem laboratorial para a malária em SH da Região Amazônica brasileira considerando: o uso de *pool* de amostras, a incidência da doença e a prevalência de PAP;
- Avaliar a eficácia e a segurança, bem como o custo-efetividade, do uso de métodos alternativos para a triagem clínica e laboratorial para a malária, como, por exemplo, a adição de riboflavina seguida da irradiação com raios ultravioleta para eliminação do *Plasmodium* dos hemocomponentes.
- Incluir na Ficha de Notificação do SIVEP-Malária um campo com a pergunta “Você doou sangue nos últimos 30 dias?” e estabelecer um fluxo de informação entre a Unidade Notificante e o SH. Essa recomendação pode ser útil tanto para a redução do risco de MTT como para a identificação e tratamento oportuno de casos para redução da letalidade.
- Incluir na Ficha de Notificação do SIVEP-Malária um campo com a pergunta “Você recebeu sangue nos últimos 30 dias?” e estabelecer um fluxo de informação entre a Unidade Notificante e o SH. Essa

recomendação pode aumentar a sensibilidade do SNH, permitir o bloqueio de outros hemocomponentes que ainda estejam no estoque do SH e rastrear outros receptores de hemocomponentes do mesmo doador.

- Fortalecer a hemovigilância na Região Amazônica brasileira, com enfoque na definição de protocolo para as reações febris tardias pós-transfusionais que inclua a suspeita de MTT como diagnóstico provável desta reação transfusional;
- Organizar, com o protagonismo das autoridades regulatórias em sangue (Anvisa e MS), um painel de especialistas para debater a utilidade do IPA como parâmetro para seleção de doadores e uma melhor definição de município com transmissão ativa.
- Debater os critérios específicos a serem utilizados para doadores de municípios da Região Amazônica brasileira com ausência de transmissão de malária por longo período de tempo (por exemplo, nos últimos cinco anos). Nesse caso, seria importante avaliar se os critérios de triagem clínica e epidemiológica de doadores desses municípios poderiam ser os mesmos adotados para residentes em municípios localizados fora da área endêmica. Isso significa que não fariam mais a triagem laboratorial, e aumentariam a sensibilidade da triagem clínica e epidemiológica;
- Assegurar que a vigilância sanitária intensifique, durante as inspeções dos SH da Região Amazônica brasileira, a verificação dos critérios regulatórios para prevenção da MTT e determine o seu cumprimento.

8. CONCLUSÃO

A *Nested PCR* para detecção de plasmódios em *pool* de amostras de sangue total apresentou alta sensibilidade analítica comparada à sensibilidade conhecida da gota espessa e se mostra como uma alternativa para a triagem laboratorial para a malária de doadores de sangue em SH de regiões endêmicas.

A maior prevalência de infecção por *Plasmodium* em doadores de sangue aptos na triagem clínica e epidemiológica obtida nos SH avaliados neste estudo foi de 0,11% (IC95%: 0,01% a 0,69%). Este valor foi obtido entre os doadores aptos de um SH localizado em um município de alto risco (IPA>49,9 lâminas positivas por 1.000 habitantes).

A prevalência de fatores de risco para infecção por *Plasmodium* é alta entre os candidatos a doação de sangue da Região Amazônica brasileira. Isso revela que não é possível utilizar triagem clínica e epidemiológica baseada nesses fatores de risco para excluir candidatos à doação, como se faz para outras doenças transmitidas pelo sangue, sob o risco de se gerar desabastecimento de sangue em áreas endêmicas para malária.

O uso da gota espessa como teste para a triagem laboratorial para malária deve ser descontinuado no contexto de SH pela sua baixa sensibilidade em indivíduos assintomáticos e dificuldades operacionais (capacitação continuada dos profissionais). O uso de NAT de alta sensibilidade parece ser mais adequado e seu custo-efetividade necessita ser avaliado nos diferentes cenários dos SH segundo a incidência da doença e prevalência de PAP.

A adesão ao cumprimento dos critérios normativos, vigentes desde 2002, para a prevenção da MTT era negligenciada pelos SH avaliados. Nenhum SH avaliado obteve classificação “adequada” tanto na classificação geral como nos componentes de triagem clínica e triagem laboratorial.

Aperfeiçoamentos na regulação sanitária são necessários para que se previna adequadamente a MTT.

Devido à alta incidência da malária na Região Amazônica brasileira, à gravidade dos casos induzidos pela transfusão de hemocomponentes e à imprecisão ou insuficiência das normas para a adequada triagem de candidatos à doação nos SH, atenção especial deve ser dada ao tema. O presente estudo oferece achados relevantes e inéditos para apoiar esse debate.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MP, Lacerda MV *et al.* Emerging Infectious Disease.2010;16:1611-4.
- Ali M, Kadaru A. In vitro processing of donor blood with sulfadoxine-pyrimethamine for eradication of transfusion-induced malaria. Am J Trop Med Hyg. 2005;73:1119-23.
- Alves F, Durlacher R, Menezes M, Krieger H, Silva L, Camargo E. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native amazonian populations. Am J Trop Med Hyg. 2002;66:641-8.
- Alves F, GiL L, Marrelli M, Ribolla P, Camargo E, Silva L. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. J Med Ent. 2005;42:777-9.
- Amato-Neto V, Sant'Ana EJ, Pinto PL, Moreira AA, Duarte MI, Campos R. Estudo experimental sobre a possibilidade de prevenção da malária pós-transfusional, através do uso da violeta de genciana. Rev Saúde Pública. 1987;21:497-500.
- Andrade A, Martelli C, Oliveira R, Arias J, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. Clin Infec Dis. 1995;20:475.
- Andrade J, Wanderley D. Malária induzida no estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1991;24:157-62.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada n° 343. Diário Oficial da União de 13 de dezembro de 2002.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n° 153. Diário Oficial da União de 14 de junho de 2004.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de Hemovigilância 2007-2008, Brasília: Anvisa, 2010.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada n° 57. Diário Oficial da União de 16 de dezembro de 2010.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012. Relatório de Hemovigilância: Dados consolidados 2007 a 2011, Brasília: Anvisa, 2012.
- Batista-dos-Santos S, Raiol M, Santos S, Cunha M, Ribeiro-dos-Santos A. Real-time PCR diagnosis of *Plasmodium vivax* among blood donors. Malar J. 2012;11:345.
- Brasil. Lei Federal n° 7.649. Diário Oficial da União de 27 de janeiro de 1988.
- Braz LM, Amato-Neto V, Carignani FL, Fernandes AO, Hamerschlak N, Zuanella LS *et al.* Estudo sobre a eventual utilidade de raios gama na profilaxia da malária transmissível por transfusão de sangue. Rev Soc Bras Med Trop. 1988;31:549-52.

- Braz RM, Duarte EC, Tauil PL. Caracterização das epidemias de malária nos municípios da Amazônia Brasileira em 2010. *Cad Saúde Pública*. 2013;29:935-44.
- Candolfi E. Transfusion transmitted malaria, preventive measures. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2005;12:107-13.
- Choudhury N, Phadke S. Transfusion transmitted diseases. *Indian J Pediatr*. 2001;68:951-8.
- Chuma J, Okungu V, Molyneux C. Barriers to prompt and effective malaria treatment among the poorest population in Kenya. *Malar J*. 2010;9:144.
- Contandriopoulos A, Champagne F, Denis J, Pineault R. Avaliação na área da saúde: conceitos e métodos. *In: Hartz ZMA (org.). Avaliação em Saúde: dos Modelos conceituais à prática na análise da implantação de programas*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1997.
- Contreras CE, Donato M, Rivas MA, Rodolfo H, Mora R, Batista ME *et al*. Malaria seroprevalence in blood bank donors from endemic and non-endemic areas of Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:123-9.
- Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:229-37.
- Diamante C, Bergfeld W, Belsito D, Klaassen C, Marks J, Shank R *et al*. Final report on the safety assessment of Basic Violet 1, Basic Violet 3, and Basic Violet 4. *Int J Toxicol*. 2009;28:193-204.
- Docampo R, Moreno S, Gadelha F, Souza W, Cruz F. Prevention of Chagas' disease resulting from blood transfusion by treatment of blood: toxicity and mode of action of gentian violet. *Biomed Environ Sci*. 1988;1:406-13.
- Donabedian A. The quality of care. How can it be assessed? *JAMA*. 1988;260:1743-8.
- Echeverri D, Barreto DK, Osorio L, Cortés A, Martínez E. Malaria por *Plasmodium vivax* transmitida por transfusión de un donante asintomático a un recién nacido prematuro. *Biomédica*. 2012;32:8-12.
- El Chaar M, Atwal S, Freimanis GL, Dinko B, Sutherland CJ, Allain JP. Inactivation of *Plasmodium falciparum* in whole blood by riboflavin plus irradiation. *Transfusion*. 2013;53:3174-83.
- Freitas DRC, Gomes LT, Fontes CJF, Tauil PL, Pang L, Duarte EC. Sensitivity of nested-PCR for *Plasmodium* detection in pooled whole blood samples and its usefulness to blood donor screening in endemic areas. *Transfus Apher Sci*. 2014; doi:10.1016/j.transci.2014.01.016.
- Freitas DRC, Simões BJ, Araújo WN. Avaliação do Sistema Nacional de Hemovigilância dos anos de 2002 a 2005. *Cad Saúde Colet*. 2010;18:179-86.
- Fujikaha E, Fornazari P, Penhalbel R, Lorenzetti A, Maroso R, Amoras J *et al*. Molecular screening of *Plasmodium* sp asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2007;49:1-4.
- Gama BE, Lacerda MVG, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*

- parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(Suppl. I):159-66.
- 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 Sang. 2008;95:226-31.
- Garraud O, Relave J, Fiori P, Perraut R. Post-transfusion malaria: is the risk irreconcilable with biological silence? Transfus Clin Biol. 2004;11:87-94.
- International Regulatory Harmonization. Report of 15th International Conference of Drug Regulatory Authorities. WHO Drug Information. 2012;26:340-61.
- Kitchen A, Chiodini P. Malaria and blood transfusion. Vox Sang. 2006;90:77–84.
- Kitchen A, Barbara J, Hewitt P. Documented cases of post-transfusion malaria occurring in England: a review in relation to current and proposed donor-selection guidelines. Vox Sang. 2005;89:77–80.
- Kitchen A, Mijovic A, Hewitt P. Transfusion-transmitted malaria: current donor selection guidelines are not sufficient? Vox Sang. 2005;88:200-1.
- Ladislau JLB. Avaliação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária no contexto da descentralização [dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro(RJ): Universidade de Brasília; 2005.
- Leite H, Navarro M. Risco potencial: um conceito de risco operativo para vigilância sanitária. Costa, EA. (org). Vigilância Sanitária: temas para debate [online]. 1ª Ed. Salvador: EDUFBA; 2009.
- Leoratti F. Resposta imune humoral na malária humana: quantidade e qualidade de anticorpos anti-Plasmodium falciparum [Dissertação de Mestrado]. São Paulo(SP): FMUSP; 2004.
- Littlefield M, Blackwell B, Hewitt C, Gaylor D. Chronic toxicity and carcinogenicity studies of gentian violet in mice. Fundament Appl Toxicol. 1985;5:902-12.
- Lomar A, Vidal J, Lomar F, Barbas C, Matos G, Boulos M. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. Braz J Infect Dis. 2005;9:425–30.
- Ministério da Saúde. Portaria nº 721. Diário Oficial da União de 11 de agosto de 1989.
- Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. 2ª Ed. Brasília: Editora MS; 2009.
- Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica: Malária. 7ª Ed. Brasília: Editora MS; 2010.
- Ministério da Saúde. Portaria nº 1.353. Diário Oficial da União de 13 de junho de 2011.
- Ministério da Saúde(a). Boletim Epidemiológico. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. Brasília: Editora MS, 2013a.
- Ministério da Saúde(b). Portaria MS nº 2.712. Diário Oficial da União de 12 de novembro de 2013.
- Mungai M, Tegmeier G, Chamberland M, Parise M. Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999. N Engl J Med. 2001;344:1973-78.

- Nansseu JR, Noubiap JJ, Ndoula ST, Zeh AF, Monamele CG. What is the best strategy for the prevention of transfusion-transmitted malaria in sub-Saharan African countries where malaria is endemic? *Malar J.* 2013;12:465.
- Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, Gyorkos T, MacLean J, Ward B. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2694-2700.
- Novaes H. Evaluation of health programs, services and technologies. *Rev Saude Publica.* 2000;34:547-9.
- Olaya-de-Morales P, Espinal-Tejada C. Detection of antiplasmodium antibodies by ELISA in blood donors. *Biomédica.* 1982;2:57-62.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda M, Brasil P, Ladislau J, Taui P, Daniel-Ribeiro C. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J.* 2010;9:115.
- Owusu-Ofori AK, Parry C, Bates I. Transfusion-transmitted malaria in countries where malaria is endemic: a review of the literature from Sub-Saharan Africa. *CID* 2010;51:1192-8.
- Pasaribu AP, Chokejindachai W, Sirivichayakul C, Tanomsing N, Chavez I, Tjitra E *et al.* A randomized comparison of dihydroartemisinin-piperaquine and artesunate-amodiaquine combined with primaquine for radical treatment of vivax malaria in Sumatera, Indonesia. *JID.* 2013;208:1906-13.
- Peru. Ministerio de la Salud. Sistema de gestion de la calidad del PRONAHEBAS. 1ª Ed. Lima: MINSAL; 2004.
- Pompera GJ, Wub Y, Snyder EL. Risks of transfusion-transmitted infections: 2003. *Curr Opin Hematol.* 2003;10:412-8.
- Prashanth G, Maralihalli M, Bagalkot P, Joshi S. Intravenous artesunate for transfusion-transmitted *Plasmodium vivax* malaria in a preterm neonate. *Pediatrics.* 2012;130:706-9.
- Proux S, Suwanarusk R, Barends M, Zwang J, Price R, Leimanis M *et al.* Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. *Malar J.* 2011;10:323.
- Purdy E, Perry E, Gorlin J, Jensen K. Transfusion-transmitted malaria: unpreventable by current donor exclusion guidelines? [letter]. *Transfusion.* 2004;44:464.
- Rajab J, Waithaka P, Orinda D, Scott C. Analysis of cost and effectiveness of pre-transfusion screening of donor blood and anti-malarial prophylaxis for recipients. *East Afr Med J.* 2005;82:565-71.
- Sáez-Alquézar A, Ramos A, Santi S, Branquinho M, Kirchgatter K, Cordeiro I *et al.* Controle da malaria transfusional em região endêmica e não endêmica do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1988;31:27-34.
- Scuracchio P, Vieira S, Dourado D, Bueno L, Colella R, Ramos-Sanchez E *et al.* Transfusion-transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2011;53:55-9.
- Seed CR, Kitchen A, Davis TME. The Current Status and Potential Role of Laboratory Testing to Prevent Transfusion-Transmitted Malaria. *Transfusion Medicine Reviews.* 2005;19:229-40.

- Shehata N, Kohli M, Detsky A. The cost-effectiveness of screening blood donors for malaria by PCR. *Transfusion*. 2004;44:217-28.
- Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM *et al*. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally-driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Trop*. 2012;121:281-91.
- Slinger R, Giulivi A, Bodie-Collins M, Hindieh F, John R, Sher G *et al*. Transfusion-transmitted malaria in Canada. *CMAJ*. 2001;164:377-9.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu X, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario V *et al*. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;61:315-20.
- Solheim B. Pathogen reduction of blood components. *Transfus Apher Sci*. 2008;39:75-82.
- Tada M, Ferreira R, Katsuragawa T, Martha R, Costa J, Albrecht L *et al*. Asymptomatic infection with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Brazilian Amazon basin: to treat or not to treat? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:621-9.
- Torres K, Figueiredo D, Zalis M, Daniel-Ribeiro C, Alecrim W, Ferreira-da-Cruz M. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. *Parasitol Res*. 2006;98:519–24.
- Uchimura K, Bosi M. Quality and subjectivity in the evaluation of health services and programs. *Cad Saúde Pública*. 2002;18:1561-9.
- Wollsey G. Transfusion for pernicious anemia: two cases. *Ann Surg*. 1911;53:132-5.
- World Health Organization. World Malaria Report. WHO Press: Geneve; 2012.
- World Health Organization. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections: recommendations. 1st Ed. WHO Press: Geneve; 2010.
- Yang SL, Di Santi SM, Amato-Neto V, Moreira AA, Pinto PL, Boulos M *et al*. Ação in vitro da violeta genciana sobre formas evolutivas do *Plasmodium falciparum*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1988;30:17-20.
- Yenen O, Keskin K, Çavuslu S, Koçak N, Tübek M. A case of *Plasmodium vivax* infection transmitted by renal allograft. *Nephrol Dial Transplant*. 1994;9:1805-6.

10. APÊNDICES

Apêndice 1. Quadro com o resumo da regulação sanitária para prevenção da transmissão da malária por transfusão de sangue e componentes, Brasil, 1950 a 2013.

Ano	Regulamentação	Requisitos	
1950	Lei 1.075	Primeira lei brasileira que trata do tema hemoterapia. Não há nenhum requisito de qualidade e segurança para seleção de doadores, mas é o embrião da obrigatoriedade da doação voluntária e não remunerada no Brasil.	
1965	Lei 4.701	Estabelece como política da atividade hemoterápica no Brasil o estabelecimento de medidas de proteção individual do receptor de sangue; Cria a Comissão Nacional de Hemoterapia que, entre outras atribuições, deve: <ul style="list-style-type: none"> • Estabelecer requisitos mínimos para a qualidade do sangue; • Fiscalizar os órgãos executivos da atividade hemoterápica. 	
1969	Portaria (sem número) da Comissão Nacional de Hemoterapia do Ministério da Saúde	Triagem clínica Histórico de malária: <ul style="list-style-type: none"> • Indivíduos com malária assintomática há dois anos serão rejeitados provisoriamente; • Indivíduos com malária atual estão aptos a doar sangue somente para o preparo do plasma; Exposição a áreas de risco: <ul style="list-style-type: none"> • não há critérios estabelecidos. Triagem laboratorial <ul style="list-style-type: none"> • Estabelece a obrigatoriedade de provas sorológicas para sífilis (lues) e Doença de Chagas, mas não cita a malária. 	
1988	Lei nº 7.649	Obrigatoriedade da realização de triagem laboratorial em todas as doações para as seguintes infecções: Hepatite B, Sífilis, Doença de Chagas, Malária e AIDS.	
1988	Decreto nº 95.721	Áreas indenes	Áreas endêmicas
		Triagem laboratorial: <ul style="list-style-type: none"> • Exclui a obrigatoriedade de triagem laboratorial para malária nas áreas indenes 	Triagem laboratorial: <ul style="list-style-type: none"> • Determina que os testes laboratoriais para malária sejam realizados apenas nas áreas endêmicas, que serão definidas pelo Ministério da Saúde

<p>1989 Portaria MS nº 721</p> <p>Triagem Clínica:</p> <ul style="list-style-type: none"> Exclui definitivamente da doação os indivíduos com diagnóstico de malária por <i>P. malariae</i> (mantido em todas as normas posteriores). <p>Exposição a áreas de risco:</p> <ul style="list-style-type: none"> Exclui da doação, por 6 meses, os indivíduos que estiveram em áreas endêmicas para malária com transmissão ativa. Não definiu “transmissão ativa”. 	<p>Triagem Clínica:</p> <ul style="list-style-type: none"> Exclui definitivamente da doação os indivíduos com diagnóstico de malária por <i>P. malariae</i> (mantido em todas as normas posteriores). <p>Para áreas com transmissão ativa:</p> <p>Histórico de malária</p> <ul style="list-style-type: none"> Excluir indivíduos com febre nos últimos 30 dias. <p>Exposição a áreas de risco:</p> <ul style="list-style-type: none"> Recrutamento em áreas de baixa transmissão <p>Áreas sem transmissão:</p> <p>Histórico de malária</p> <ul style="list-style-type: none"> Excluir da doação indivíduos que tiveram malária nos últimos 12 anos. <p>Exposição a áreas de risco:</p> <ul style="list-style-type: none"> Excluir da doação, por 6 meses, os indivíduos que estiveram em áreas endêmicas para malária com transmissão ativa. <p>Triagem laboratorial:</p> <ul style="list-style-type: none"> Recomenda a realização de testes parasitológicos nas áreas com transmissão ativa e de testes sorológicos nas áreas sem transmissão
<p>1993 Portaria MS nº 1.376</p> <p>Repetiu Portaria MS nº 721/1989 e acrescenta:</p> <p>Triagem clínica:</p> <p>Histórico de malária</p> <ul style="list-style-type: none"> exclui temporariamente indivíduos que tiveram malária nos últimos 3 anos 	<p>Repetiu Portaria MS nº 721</p>

<p>2000 Resolução Mercosul nº 42</p> <p>Repetiu a Portaria MS nº 1.376/1993 e acrescenta: Triagem clínica: Histórico de malária</p> <ul style="list-style-type: none"> • excluir temporariamente da doação indivíduos que residiram em áreas endêmicas de malária nos últimos 3 anos. <p>Triagem laboratorial:</p> <ul style="list-style-type: none"> • não menciona 	<p>Triagem clínica: Exclui o conceito de áreas com transmissão ativa e áreas sem transmissão, considerando apenas a divisão de áreas endêmicas e não endêmicas. Histórico de malária</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alterou o prazo de exclusão de indivíduos com história de malária de 12 anos para 12 meses. • Excluir indivíduos com febre nos últimos 30 dias. <p>Exposição a áreas de risco: Definiu que o Índice Parasitário Anual (IPA) deveria ser utilizado para a seleção dos doadores em relação à estadia ou residência em área de risco:</p> <ul style="list-style-type: none"> • excluir indivíduos que estiveram em áreas com IPA alto risco (>49,9 lâminas positivas por 1.000 habitantes) • aceitar indivíduos de áreas com IPA de médio (>9,9 e <50 lâminas positivas por 1.000 habitantes) e baixo risco (<10 lâminas positivas por 1.000 habitantes) e submeter a exame parasitológico. <p>A norma não definiu o nível de agregação da área para o IPA (bairro, município, região ou estado).</p> <p>Triagem laboratorial:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obriga o teste parasitológico em indivíduos residentes ou que estiveram em áreas de IPA médio e baixo • Obriga o teste parasitológico em indivíduos que tiveram malária entre 12 e 36 meses anteriores a doação.
<p>2001 Lei nº 10.205</p>	<p>Permitiu que o Ministério da Saúde autorizasse a testagem de amostras em <i>pools</i>, desde que os avanços tecnológicos justificassem essa medida.</p>

2002	RDC Anvisa nº 343	Repetiu a Resolução Mercosul nº 42	<p>Triagem clínica: Repetiu a Resolução Mercosul nº 42</p> <p>Triagem laboratorial:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obriga a realização de testes parasitológicos nas áreas com IPA de alto risco. • Recomenda testes sorológicos nas outras áreas, o que parece contradizer o que foi definido na seção de triagem clínica (obriga o teste para residentes em áreas de IPA médio e baixo).
2004	RDC Anvisa nº 153	Repetiu a RDC 343/2002	
2010	RDC Anvisa nº 57	<p>Triagem clínica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • estabelece que os parâmetros para seleção de doadores devem seguir os critérios definidos pelo Ministério da Saúde. <p>Triagem laboratorial:</p> <ul style="list-style-type: none"> • obriga o teste laboratorial parasitológico ou de detecção de antígenos plasmodiais nos municípios com IPA de alto risco. 	
2011	Portaria MS nº 1.353	<p>Triagem clínica: Histórico de malária</p> <ul style="list-style-type: none"> • permite a doação por indivíduos com história de malária após 12 meses do tratamento e comprovação de cura. <p>Exposição a áreas de risco:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Exclui por 30 dias o indivíduo que se deslocou para municípios da área endêmica • Permite a doação, desde que realize a triagem laboratorial, do indivíduo que se deslocou para municípios da área endêmica após 30 dias e até 12 meses do deslocamento. • Indivíduos procedentes de municípios localizados em áreas endêmicas estão impedidos por 12 meses a contar da data da mudança de domicílio. <p>Surtos de malária</p> <ul style="list-style-type: none"> • os critérios de inaptidão devem ser avaliados em conjunto com a autoridade epidemiológica competente 	<p>Triagem clínica: Repetiu os critérios de exclusão definidos na RDC 153/2004 e acrescenta:</p> <p>Triagem clínica:</p> <p>Exposição a áreas de risco:</p> <ul style="list-style-type: none"> • define que o município é o nível de agregação para o IPA. • define que o período de inaptidão para os indivíduos com deslocamento para áreas de alto risco é de 30 dias. <p>Triagem laboratorial:</p> <ul style="list-style-type: none"> • obriga o teste parasitológico ou de detecção de antígenos plasmodiais em todas as doações dos serviços de hemoterapia localizados em área endêmica com transmissão ativa, independentemente do IPA. Não definiu o conceito de transmissão ativa.
2013	Portaria MS nº 2.712	Repetiu a Portaria MS 1.353/2011	Repetiu a Portaria MS 1.353/2011

Apêndice 2. Questionário epidemiológico para coleta de dados

PESQUISA TRANSMISSÃO DE MALÁRIA TRANSFUSIONAL

Aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FM-UnB e da HUJM da UFMT

Este questionário somente deve ser aplicado após o entrevistado ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e após concluir a coleta da amostra de sangue.

Local da pesquisa:

() SH-A () SH-B () SH-C () SH-D

Data da entrevista: ____/____/2010 Questionário n°

Entrevistador _____

Identificação do entrevistado	
Número do cadastro do doador no hemocentro:	
Número do cadastro da doação no hemocentro:	
Qual o nome completo do Sr(a)?	Tel ()
Sexo: () Masculino () Feminino	Quantos anos o sr(a) tem? [] () não sabe
Vamos falar sobre seu local de residência	
Nos últimos 30 dias, qual foi seu endereço residencial (de moradia)?	
Rua ou lugarejo:	n° () Urbano () Rural
Bairro:	Cidade: UF:
Nos últimos 30 dias, o sr(a) soube de alguém que tenha ficado doente de malária próximo a sua residência?	() Sim () Não () Não sabe
O Sr(a) já morou fora da região amazônica alguma vez na vida? (<i>considerar apenas períodos > 1 ano</i>) (<i>Estados da região amazônica: AC, AM, AP, MA, MT, PA, RO, RR, TO</i>)	() Sim () Não = Pule para próximo bloco () Não sabe
SE SIM , faz quantos anos que o Sr(a) mora na região amazônica? (<i>calcular com o entrevistado o tempo total em anos que ele mora ou morou na Amazônia, incluindo todos os períodos, intermitentes ou não</i>) [] () não sabe	
Vamos falar sobre seu local de estudo	
O Sr(a) está estudando?	() Sim () Não = Pule para próximo bloco () Não sabe
SE SIM , qual o endereço da instituição que o Sr(a) estudou nos últimos 30 dias?	
Rua ou lugarejo:	n° () Urbano () Rural
Bairro:	Cidade: UF:
Nos últimos 30 dias, o sr(a) soube de alguém que tenha ficado doente de malária na sua escola?	() Sim () Não () Não sabe
Vamos falar sobre seu local de trabalho	
O Sr(a) está trabalhando no momento?	() Sim () Não = Pule para próximo bloco () Não sabe
SE SIM , qual a sua ocupação atual? (<i>considerar a função que exerce atualmente e não a formação técnica ou acadêmica</i>)	

O Sr(a) trabalha fora de casa em algum endereço fixo? (<i>endereço fixo significa permanecer em um mesmo local durante a maior parte da jornada de trabalho diária</i>)		() Sim () Não () Não sabe
Rua ou lugarejo:	() Urbano	() Rural
Bairro:	Cidade:	UF:
Nos últimos 30 dias, o sr(a) soube de alguém que tenha ficado doente de malária no seu local de trabalho?		() Sim () Não () Não sabe
Vamos falar sobre deslocamentos ou viagens para outras cidades		
Nos últimos 30 dias, o sr(a) se deslocou, visitou ou viajou para alguma outra cidade além da cidade de moradia, de trabalho ou de estudo? (<i>considerar apenas as cidades em que o entrevistado permaneceu por mais de 1 hora</i>)		() Sim () Não = Pule para próximo bloco () Não sabe
SE SIM , por favor, me informe quais as cidades e o tempo de permanência que ficou em cada uma delas. Use o verso, se necessário.		
Cidade	UF	Tempo de permanência (em dias). Se passou algumas horas, registrar "<1".
Vamos falar sobre deslocamentos ou viagens para sítios, chácaras, fazendas, matas, garimpos.		
Nos últimos 30 dias, o sr(a) se deslocou, visitou ou viajou para locais como chácaras, sítios, fazendas ou locais com mata ou floresta ou garimpos?		() Sim () Não=Pule para próximo bloco () Não sabe
SE SIM , o sr(a) soube de alguém que tenha ficado doente de malária nestas áreas rurais ou silvestres que o senhor visitou?		() Sim () Não () Não sabe
Vamos falar sobre a malária		
O Sr(a) teve malária nos últimos 30 dias?		() Sim () Não () Não sabe
O Sr(a) teve malária nos últimos 12 meses?		() Sim () Não () Não sabe
Alguma vez na vida o Sr(a) já teve malária?	() Sim () Não = Pule para próximo bloco () Não sabe	
SE SIM , quantas malárias o Sr(a) já teve? [] () não sabe		
Caso o entrevistado não lembre quantas vezes, pergunte: Qual destes intervalos de quantidades melhor representa seu adoecimento por malária? () 0 a 10 () 10 a 20 () 20 a 30 () 30 a 40 () 40 a 50 () 50 ou +		
O Sr(a) tomou remédio para curar da malária nos últimos 30 dias?	() Sim () Não () Não sabe	
O Sr(a) tomou remédio para curar da malária nos últimos 12 meses?	() Sim () Não () Não sabe	
Alguma vez na vida o Sr(a) tomou remédio para tratar da malária?	() Sim () Não = Pule para próximo bloco () Não sabe	
SE SIM , quantas vezes? (<i>use os intervalos acima se necessário</i>) [] () não sabe		
Nos últimos 30 dias, o Sr(a) fez o teste para malária, aquele teste que o profissional de saúde fura seu dedo e coloca uma gota de sangue em uma lâmina de vidro?		() Sim () Não () Não sabe

Sem considerar aqui no hemocentro, nos últimos 12 meses o Sr(a) fez o teste para malária, aquele teste que o profissional de saúde fura seu dedo e coloca uma gota de sangue em uma lâmina de vidro?	() Sim () Não () Não sabe
Ainda sem considerar aqui no hemocentro, alguma vez na vida o Sr(a) fez o teste para malária, aquele teste que o profissional de saúde fura seu dedo e coloca uma gota de sangue em uma lâmina de vidro?	() Sim () Não () Não sabe
SE SIM , quantas vezes? (use os intervalos acima se necessário) []	() não sabe
Alguma vez o resultado foi positivo?	() Sim () Não () Não sabe
SE SIM , quantas vezes os resultados foram positivos? []	() Não sabe
Positivo para <i>Plasmodium vivax</i> ? () Sim () Não () Não sabe. Se sim, quantas vezes? [] () Não sabe	
Positivo para <i>Plasmodium falciparum</i> ? () Sim () Não () Não sabe. Quantas vezes? [] () Não sabe	
Positivo para <i>Plasmodium malariae</i> ? () Sim () Não () Não sabe. Quantas vezes? [] () Não sabe	

Agradeça a atenção e o tempo do entrevistado para esta pesquisa
Ficha complementar à entrevista. Deve ser preenchida com os resultados da triagem clínica e da triagem laboratorial do doador

Identificação do entrevistado	
Número do cadastro do doador no hemocentro:	
Número do cadastro da doação no hemocentro:	
Sinais vitais	
Peso (em quilos): [] Kg	Altura (em centímetros) [] cm
Hematócrito: [] %	Temperatura corporal: [] °C
Pressão arterial: [] x [] mmHg	Pulso: [] bpm
Ficha de triagem	
Teve febre nos últimos 30 dias?	() Sim () Não () Não sabe
Resultado da triagem clínica: () apto () inapto	
Se inapto, qual o motivo da inaptidão clínica?	
Resultado da triagem laboratorial para malária	() Positivo () Negativo () Não realizado
Tipo de teste utilizado:	() gota espessa () esfregaço () imunocromatográfico () Outro Descrever outro:
O doador contatou o hemocentro relatando febre ou diagnóstico positivo de malária 20 dias após a doação?	() Sim () Não

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa

NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO..... Nº
BAIRRO:..... CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD(.....)

Declaração do participante:

Eu, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação do risco de transmissão de malária transfusional na área endêmica brasileira”.

Eu discuti com o(a) pesquisador(a) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

....., de de 20.....

Assinatura do participante

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante para a participação neste estudo.

....., de de 20.....

.....
Pesquisador responsável pela abordagem do participante

.....
Daniel Roberto Coradi de Freitas
(pesquisador responsável nacional)

Apêndice 3. Questionário utilizado na avaliação normativa

NOME DO HEMOCENTRO _____

Roteiro para avaliação normativa dos serviços de hemoterapia com foco na estrutura, processo e resultado da prevenção de transmissão transfusional de malária

Recepção do doador:

Perguntar ao chefe da unidade de recepção do doador e/ou ao responsável técnico

1. Quais dos documentos abaixo são aceitos para identificação dos doadores na recepção dos doadores?

() documento oficial com foto – RG, Carteira de habilitação com foto, carteira de trabalho, carteira de identidade emitida por Conselho Profissional

() CPF

() Crachá de identidade da empresa onde trabalha

() Carteira de estudante

() Outro. Descrever _____

2. O doador é informado na recepção sobre as condições básicas de saúde para que ele possa ser doador de sangue?

() sim () não

Se SIM, responda a pergunta 3.

Se NÃO, pule para a pergunta 4.

3. Quais as formas que o serviço utiliza para informar o doador, no momento da recepção, sobre as condições básicas de saúde para que ele possa ser doador de sangue?

() Folder explicativo

() Vídeos explicativos na sala de espera

() Informação passada verbalmente pelo recepcionista

() Outros _____

4. O doador é informado na recepção sobre as doenças transmitidas pelo sangue?

() sim () não

Se SIM, responda a pergunta 5.

Se NÃO, pule para o bloco Triagem Clínica.

5. Quais as formas que o serviço utiliza na recepção para informar o doador sobre as doenças transmitidas pelo sangue?

() Folder explicativo

() Vídeos explicativos na sala de espera

() Informação passada verbalmente pelo recepcionista

() Outros _____

Se marcou informação passada verbalmente, vá para pergunta 6.

Se utiliza algum material, solicitar os materiais disponíveis atualmente ou os já utilizados (folder ou vídeo explicativo). O pesquisador deve observar quais as doenças transmitidas pelo sangue que são abordadas nos materiais.

- AIDS
- Hepatite B
- Hepatite C
- Sífilis
- Doença de Chagas
- Malária
- Doenças relacionadas ao HTLV
- Outras _____

6. Se a informação é passada verbalmente pelo recepcionista, existe algum documento que oriente o recepcionista para esta atividade?

- sim
- não

Se NÃO, pule para o bloco Triagem Clínica

Se sim, o pesquisador deve solicitar os documentos utilizados pelos recepcionistas. O pesquisador deve observar quais as doenças transmitidas pelo sangue que são abordadas nos documentos.

- AIDS
- Hepatite B
- Hepatite C
- Sífilis
- Doença de Chagas
- Malária
- Doenças relacionadas ao HTLV
- Outras _____

Se malária foi apontada na pergunta anterior, o pesquisador deve assinalar os itens abaixo que constam nos documentos dos recepcionistas e/ou materiais educativos direcionados aos doadores para prevenção de transmissão transfusional de malária.

- Teve malária nos últimos 12 meses
- Está tomando medicamento para malária
- Reside em área ou região com alta incidência parasitária anual ou com grande número de casos de malária
- Residiu em área ou região com alta incidência parasitária anual ou com grande número de casos de malária nos últimos 30 dias
- Visitou área ou região com alta incidência parasitária anual ou com grande número de casos de malária nos últimos 30 dias meses
- Alguém em sua residência está com malária

- Alguém em sua residência está tomando medicamento para malária
 outras informações relevantes. Descreva _____

Triagem Clínica

Perguntar ao chefe da triagem clínica e/ou ao responsável técnico

1. A triagem clínica é realizada individualmente com cada doador?

- sim não

2. A entrevista é feita em sala fechada, individualizada, estando presente apenas doador e triagista?

- sim não

3. Qual a formação dos profissionais que realizam a triagem clínica?

- Assistentes sociais
 Biólogos
 Enfermeiros
 Farmacêuticos
 Médicos
 Psicólogos
 Técnicos de enfermagem
 Técnicos de laboratório
 Outros. Descreva _____

4. Os profissionais da triagem clínica possuem treinamento específico para esta função?

- sim não

5. Se sim, com que frequência ocorre esse treinamento?

O pesquisador solicita material de treinamento utilizado para o treinamento dos triagistas.

Caso não obtenha ou não exista, vá para pergunta 6.

Caso obtenha o material, vá para pergunta 8.

6. Nos treinamentos para triagem clínica de doadores, o tema “prevenção de transmissão de doenças pelo sangue” está incluído?

- sim não

7. Se sim, que doenças estão incluídas nestes treinamentos?

- AIDS
 Hepatite B
 Hepatite C
 Sífilis
 Doença de Chagas
 Malária
 Doenças relacionadas ao HTLV

() Outras _____

Se malária foi apontada na questão 7. Que aspectos são abordados nos materiais do treinamento? Assinale todos que estiverem presentes.

() método de cálculo da IPA

() critérios para inaptidão clínica de candidatos pelo risco de infecção por plasmódio

() critérios para a necessidade de realização da triagem laboratorial para malária

Se “critérios para inaptidão clínica de candidatos pelo risco de infecção por plasmódio” foi assinalado, marque os critérios abordados nos treinamentos.

() Teve malária nos últimos 12 meses

() Está tomando medicamento para malária

() Reside em área ou região com alta incidência parasitária anual (IPA>49,9) ou com grande número de casos de malária

() Residiu em área ou região com alta incidência parasitária anual (IPA>49,9) ou com grande número de casos de malária nos últimos 12 meses

() Visitou área ou região com alta incidência parasitária anual (IPA>49,9) ou com grande número de casos de malária nos últimos 12 meses

() Alguém em sua residência está com malária

() Alguém em sua residência está tomando medicamento para malária

() outras informações relevantes.

Descreva _____

8. Existem documentos na sala do triagista que o oriente para os critérios de exclusão clínica de doadores?

() Sim () Não

O pesquisador deve obter este documento e verificar se o material inclui critérios de avaliação de risco de transmissão para as seguintes doenças:

() AIDS

() Hepatite B

() Hepatite C

() Sífilis

() Doença de Chagas

() Malária

() Doenças relacionadas ao HTLV

() Outras _____

9. Existe algum documento específico para a malária?

() Sim () Não

Caso exista nenhum documento, vá para pergunta 11.

10. Estão presentes nos documentos os critérios para inaptidão clínica de candidatos pelo risco de infecção por plasmódio previstos na RDC ANVISA 153/2004 listados abaixo?

- Rejeitar o candidato que tenha tido malária nos 12 meses que antecedem a doação;
- Rejeitar o candidato com febre ou suspeita de malária nos últimos 30 dias.
- Rejeitar o candidato procedente de área de alto risco de malária de acordo com o IPA ($IPA \geq 50$)
- Rejeitar o candidato com residência em área de alto risco pelo IPA ($IPA \geq 50$).
- Ter tido diagnóstico de malária por *Plasmodium malariae* (febre quartã)

11. Quais são os critérios utilizados na triagem clínica para inaptidão clínica de doadores para malária?

- Teve malária nos últimos 12 meses
- Está tomando medicamento para malária
- Reside em área ou região com alta incidência parasitária anual ($IPA > 49,9$) ou com grande número de casos de malária
- Residiu em área ou região com alta incidência parasitária anual ($IPA > 49,9$) ou com grande número de casos de malária nos últimos 30 dias
- Visitou área ou região com alta incidência parasitária anual ($IPA > 49,9$) ou com grande número de casos de malária nos últimos 30 dias
- Alguém em sua residência está com malária
- Alguém em sua residência está tomando medicamento para malária
- outros. Descreva _____

12. A incidência parasitária anual (IPA) é utilizada como critério para seleção de doadores?

- Sim Não

13. Se Sim, descreva detalhadamente o método de cálculo do IPA utilizado pelo Hemocentro. _____

14. Quais as faixas da IPA utilizadas pelo Hemocentro para definir os critérios de exclusão?

15. Existe um documento para o triagista apontando as áreas com IPA?

- Sim Não

16. Se Sim, qual o nível de agregação da IPA?

- bairro/localidade município Estado
- Distrito Regional

17. Existe no sistema informatizado a opção de exclusão clínica por malária do candidato a doação?

- sim não

Se SIM, responda a pergunta 18 a20

Se NÃO, pule para o bloco triagem laboratorial

18. Existem no sistema informatizado os motivos da exclusão clínica por malária do candidato a doação?

() sim () não

19. Existe mecanismo de segurança no sistema informatizado que alerte o triagista que o doador foi inapto para malária na última doação?

() sim () não

20. Se SIM, descreva detalhadamente este mecanismo.

Triagem Laboratorial

Perguntar ao chefe da triagem laboratorial e/ou ao responsável técnico

1. A triagem laboratorial para malária é executada para todas as doações?

() Sim () Não

Se Não, vá para pergunta 2

Se Sim, vá para pergunta 5

2. Descreva os critérios do hemocentro para inclusão de doações na triagem laboratorial para malária:

3. A incidência parasitária anual (IPA) é utilizada como critério para inclusão de doadores na triagem laboratorial para malária?

() Sim () Não

4. Quais as faixas da IPA utilizadas pelo Hemocentro para definir os critérios de inclusão de doações na triagem laboratorial para malária?

5. Quais os métodos laboratoriais utilizados para a triagem laboratorial da malária?

() Gota espessa () Imunocromatográfico
() Esfregaço () Outro. Descreva_____

6. Em que ponto do ciclo do sangue se coleta a amostra para o teste laboratorial da malária?

() Recepção () Coleta do sangue total
() Triagem clínica () Outro. Descreva:_____

7. Existem documentos padronizados para o preparo da amostra para o teste laboratorial da malária?

() Sim () Não

O pesquisador deve solicitar a cópia deste documento.

8. Existem documentos padronizados para a execução do teste laboratorial da malária?

() Sim () Não

Se o serviço NÃO executa gota espessa ou esfregaço, vá para Pergunta 15.

9. Se o teste laboratorial para malária for gota espessa ou esfregaço, qual o tempo de leitura para cada lâmina que está previsto nos documentos?

10. Em média, quantas lâminas são analisadas por dia?

11. Quantos profissionais executam a leitura das lâminas?

12. Qual a formação dos profissionais que executam a leitura das lâminas?

13. Os profissionais foram treinados para essa função?

() Sim () Não

14. Com que frequência ocorre atualizações do treinamento para a execução da leitura das lâminas?

() Sim () Não

15. O serviço possui um Programa de Avaliação Externa da Qualidade em imunohematologia?

() Sim () Não

Se não, por quê?

16. O serviço possui um Programa de Avaliação Externa da Qualidade em sorologia?

() Sim () Não

Se não, por quê?

17. O serviço possui um Programa de Avaliação Externa da Qualidade para malária?

() Sim () Não

Se não, por quê?

18. O serviço utiliza Controle de Qualidade Interno (CQI) nos testes laboratoriais da Imunohematologia?

Sim Não

Se não, por quê?

19. O serviço utiliza Controle de Qualidade Interno (CQI) nos testes laboratoriais da sorologia?

Sim Não

Se não, por quê?

20. O serviço utiliza Controle de Qualidade Interno (CQI) nos testes laboratoriais da malária?

Sim Não

Se não, por quê?

21. Existe algum método para o controle de qualidade dos testes laboratoriais de malária?

Sim Não

Se Sim, descreva?

22. Nos últimos 5 anos, quantos resultados positivos para malária de doadores aptos clinicamente foram registrados no serviço?

Hemovigilância

1. Existe algum mecanismo para detectar doadores que se tornaram suspeitos ou confirmados para malária após a doação?

Sim Não

2. Se Sim, qual o procedimento para lidar com essa informação? Descreva os fluxos e copie os documentos padronizados para isso, se houver. Atentar para fonte da informação, atores envolvidos.

3. Nos últimos 5 anos, houve algum caso de transmissão de malária transfusional por hemocomponentes produzidos no serviço?

Sim Não

4. Se Sim, qual o procedimento para evitar a transmissão pelos outros hemocomponentes da mesma doação?

11. ANEXOS

Pareceres de aprovação dos Comitês de Ética e Pesquisa


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 028/2009.

Título: "Avaliação do risco de malária transfusional na área endêmica brasileira."

Pesquisador Responsável: Daniel Roberto Coradê de Freitas.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 05/05/2009.

Proposição do (a) relato (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 06/05/2009.

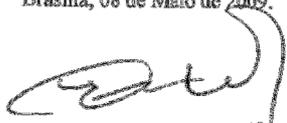
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 07/05/2009.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum", conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 08 de Maio de 2009.


Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UnB

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller
Registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em 25/08/97

TERMO DE APROVAÇÃO ÉTICA
DE PROJETO DE PÊSQUISA

REFERÊNCIA: Projeto de protocolo Nº 640/CEP-HUJM/09

“COM PENDÊNCIAS”

APROVADO “ad referendum”

APROVAÇÃO FINAL

NÃO APROVADO

O projeto de pesquisa intitulado: “**Avaliação do risco de transmissão de malária transfusional na área endêmica brasileira**”, encaminhado pelo (a) pesquisador (a) **Daniel Roberto Coradi de Freitas**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM, em reunião realizada dia 10/06/09 que concluiu pela aprovação final, tendo em vista que atende a Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos.

Cuiabá, 10 de Junho de 2009.



Profa. Dra. Shirley Ferreira Pereira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM