

ANA CLARA PINCELLI CINTRA

Malária nos primeiros dois anos de vida pós-natal de crianças na Amazônia Brasileira: fatores associados e risco de anemia aos dois anos de idade

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

São Paulo

2023

ANACLARA PINCELLI CINTRA

Malária nos primeiros dois anos de vida pós-natal de crianças na Amazônia Brasileira: fatores associados e risco de anemia aos dois anos de idade

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Versão corrigida

São Paulo

2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pincelli Cintra, Anaclara

Malária nos primeiros dois anos de vida pós-natal
de crianças na Amazônia Brasileira: fatores
associados e risco de anemia aos dois anos de idade
/ Anaclara Pincelli Cintra; orientador Marcelo
Urbano Ferreira . -- São Paulo, 2023.
105 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Malária na infância. 2. Plasmodium vivax. 3.
Amazônia. I. Urbano Ferreira , Marcelo, orientador.
II. Título.



Departamento de
PARASITOLOGIA
Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo



Decl. BMP/CPG-060/2023

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que a Sra. **ANA CLARA PINCELLI CINTRA** defendeu o título de **DOCTOR EM CIÊNCIAS**, Área: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, tendo sido aprovada em prova pública da Tese de Doutorado, realizada no dia 08 de maio de 2023 e que, oportunamente, será homologada pela Comissão de Pós-Graduação. O trabalho apresentado tem como título: **"Malária nos primeiros dois anos de vida pós-natal de crianças na Amazônia Brasileira: fatores associados e risco de anemia aos dois anos de idade"**.

A Comissão Julgadora foi constituída pelos seguintes membros: Profs. Drs. Guilherme Loureiro Werneck, Alicia Matijasevich Manitto, Erika Martins Braga e Marcelo Urbano Ferreira (Orientador).

São Paulo, 08 de maio de 2023

Profa. Dra. BEATRIZ SIMONSEN STOLF CARBONI

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

BIOLOGIA DA RELAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO ICB/USP



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Anticorpos IgG maternos e proteção contra a malária vivax clínica nos primeiros seis meses de vida

Pesquisador: Anaclara Pincelli Cintra

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 97570918.5.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.904.732

Apresentação do Projeto:

o projeto "Anticorpos IgG maternos e proteção contra a malária vivax clínica nos primeiros seis meses de vida", da proponente Anaclara Pincelli Cintra, é bem redigido e importante.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto visa um estudo epidemiológico dos anticorpos (IgG maternos) contra antígenos de PvMSP-119 e PvDBP de *P. vivax* em bebês durante os 6 primeiros meses de vida e risco subsequente de malária vivax na mesma faixa etária, combinado com uma avaliação laboratorial de características funcionais dos anticorpos maternos anti PvMSP-119 e PvDBP. Outros objetivos secundários relevantes são: "Investigar a associação entre fatores sociodemográficos e da saúde materna ao longo da gestação e os níveis de anticorpos IgG totais e de anticorpos específicos para antígenos de PvDBP e PvMSP-119 em amostras de sangue venoso materno e de sangue de cordão umbilical, coletadas no momento do parto; Avaliar a associação entre presença de anticorpos bloqueadores de ligação entre antígenos de PvDBP e PvMSP-119 e receptores de reticulócitos presentes no sangue de cordão umbilical e o tempo decorrido até o primeiro episódio de malária vivax nos primeiros seis meses de vida; Investigar, em ensaios *in vitro*, a capacidade de anticorpos IgG totais, anti-PvDBP e anti-PvMSP-119, maternos e do sangue do cordão umbilical, de inibir a invasão de *P. vivax* em reticulócitos; Otimizar técnica de leitura de ensaios de invasão por citometria de fluxo; Estimar a incidência da malária vivax clínica nos primeiros dois anos de vida,

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.904.732

os fatores nutricionais, sociodemográficos e econômicos associados com o desenvolvimento dessa doença e as implicações dessa doença para a saúde até os dois anos de idade."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As situações de risco potencial para as mães ocorrem durante as avaliações clínicas, entre 16-20ª semanas e entre 24-28ª semanas de gestação, no Posto de Saúde do Agricultor. Em cada avaliação ocorrerá uma coleta de amostra de sangue venoso (cerca de 12 mL) da gestante. Ademais, no momento do parto será necessário colher uma amostra de sangue do cordão umbilical (cerca de 12 mL) e de uma gota de sangue da placenta. A coleta de amostras será muito importante para avaliar características genéticas e presença de malária no bebê recém-nascido. No entanto, a coleta de amostras de sangue do cordão umbilical e da placenta ocorrerá após o parto; portanto, não será dolorosa nem para a mãe e nem para seu bebê. Não vejo risco desproporcional ou mesmo elevado dados os benefícios esperados da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é bem desenhado e vai utilizar protocolos experimentais bem estabelecidos. Pelo que foi apresentado no projeto, pode-se depreender que o melhor entendimento do efeito protetor de IgGs maternos em neonatos, bebês e crianças ainda necessita de mais esclarecimento o que justifica plenamente esta pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE é claro, direto e esclarecedor. Cabe aqui frisar que num país onde mais de metade da população não completou o ensino médio e quase 93% da população é analfabeta funcional QUALQUER TCL vai necessitar de esclarecimento no momento de sua apresentação aos sujeitos da pesquisa.

Recomendações:

aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não vejo pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.904.732

pesquisador cabe também finalizar o processo junto `a plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1186667.pdf	02/09/2018 16:45:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Plataforma_Brasil.pdf	02/09/2018 16:44:53	Anaclara Pincelli Cintra	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaoCEPCBdoutorado_anaclara.pdf	02/09/2018 16:41:36	Anaclara Pincelli Cintra	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	10/08/2018 13:46:16	Anaclara Pincelli Cintra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_final.pdf	09/08/2018 21:14:48	Anaclara Pincelli Cintra	Aceito
Parecer Anterior	Parecer.pdf	09/08/2018 21:13:19	Anaclara Pincelli Cintra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 19 de Setembro de 2018

Assinado por:
Camila Squarzoni Dale
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br

à minha mãe e ao Fábio

AGRADECIMENTOS

Agradeço com carinho ao Professor Marcelo Urbano Ferreira. Obrigada pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança e por tantas portas interessantes que foram abertas durante minha pós-graduação. Obrigada por ter me apresentado um mundo.

Agradeço aos participantes deste estudo e às suas mães ou responsáveis, que dedicaram tanto do seu tempo para o estudo MINA-Brasil.

Agradeço à Professora Marly Cardoso pela oportunidade de trabalhar no estudo MINA-Brasil. Agradeço também a toda equipe do estudo MINA-Brasil por ter tornado possível a realização deste trabalho, especialmente ao Paulo e à Maíra. Às equipes da maternidade do Hospital da Criança e da Mulher do Juruá e da Saúde da Família de Cruzeiro do Sul.

Agradeço aos colegas do laboratório Moa (Malaria Immunity, Genomics and Populations), pela convivência e colaboração. Às amigas que estiveram comigo no cotidiano do laboratório; à Vanessa, pela generosidade imensa e pelo dia a dia que vivenciamos na bancada; às técnicas do laboratório, Maria José, Priscila e Winni, agradeço por tanto e principalmente por terem organizado o envio de amostras para Boston e Estocolmo; à Juliana e ao Jaques; ao Igor e ao Rodrigo, por terem construído variáveis fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Professor Manoj Duraisingh e à sua equipe por terem me recebido no Department of Immunology and Infectious Diseases na Harvard T. H. Chan School of Public Health. Tive a alegria de trabalhar com biologia experimental junto a pesquisadores e estudantes acolhedores e colaborativos, que me ensinaram muito. Agradeço especialmente à Camila França e à Estela, pela generosidade e amizade. Ao Brendan, Arianna, Usheer, Martha e Kristen, meu muito obrigada!

Agradeço ao Professor José Pedro Gil por ter me recebido em seu laboratório no Instituto Karolinska. Agradeço especialmente à Dra. Taís Nóbrega, pelo acolhimento e ensinamentos. Foi uma alegria passar esse tempo em Estocolmo.

Aos colegas, professores e técnicos de laboratórios vizinhos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Agradeço a colaboração e os bons encontros de corredor. Em especial à Natália Ferreira e à Kátia Françoso, por terem dividido comigo amostras preciosas de controles negativos. Aos funcionários do ICB-USP, muito obrigada!

Aos professores que participaram da banca de qualificação deste estudo, Professor Eliseu Waldman, Professora Alicia Matijasevich, e Professora Flor Ernestina Martinez-Espinosa, pelas contribuições para a construção desta pesquisa. Agradeço especialmente à Professora Alicia Matijasevich e ao Professor Daniel Bargieri, por terem participado da minha trajetória na pós-graduação.

Agradeço de forma muito especial aos meus pais; à família e amigos; ao meu irmão, pela ajuda com os códigos do Python.

Agradeço à FAPESP pelo suporte financeiro, fundamental para a realização deste trabalho e para minha formação profissional.

Agradeço demais a generosidade de tantas pessoas que colaboraram para a construção deste estudo e para a minha formação até aqui.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Anaclara Pincelli Cintra recebeu bolsa de doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (FAPESP nº 2018/18557-5) e Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (FAPESP nº 2019/09892-8).

O presente estudo integra um conjunto de pesquisas epidemiológicas sobre condições de saúde e nutrição materno-infantil em Cruzeiro do Sul, Acre – Materno-Infantil no Acre: coorte de nascimentos da Amazônia Ocidental Brasileira (MINA-Brasil). O estudo MINA-Brasil é coordenado por pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP) em colaboração com pesquisadores da Universidade Federal do Acre (UFAC) e da *Harvard T. H. Chan School of Public Health* (HSPH).

Com verba do Programa Ciência Sem Fronteiras, chamada nº 71/2013 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), o estudo MINA-Brasil foi contemplado com auxílio à pesquisa e uma Bolsa Pesquisador Visitante Especial, para a Doutora Márcia Caldas de Castro da HSPH (CNPq nº 407255/20133). Em 2015, recursos adicionais foram concedidos pela Fundação Maria Cecília Souto Vidigal e na Chamada PPSUS 001/2015 FAPAC – Programa Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde FAPAC/SESACRE/PPSUS MS/CNPq – e, em 2017, pela FAPESP na modalidade auxílio temático à pesquisa (FAPESP nº 2017/00270-6).

MEMBROS DA COORDENAÇÃO DO MINA-BRAZIL STUDY WORKING GROUP

Dra. Alícia Matijasevich – Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina da USP; Dr. Bruno P. da Silva e Dr. Rodrigo M. de Souza – Campus Floresta, UFAC; Dra. Marly A. Cardoso, Dra. Bárbara H. Lourenço, Dra. Suely G. A. Gimeno, Dra. Maíra B. Malta, Dr. Paulo A. R. Neves – Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública da USP; Dra. Márcia C. Castro – *Department of Global Health and Population*, HSPH.

RESUMO

PINCELLI, Anaclara. **Malária nos primeiros dois anos de vida pós-natal de crianças na Amazônia Brasileira: fatores associados e risco de anemia aos dois anos de idade.** 2023. 105f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Neste estudo de coorte – aninhado ao estudo Materno-Infantil no Acre: coorte de nascimentos da Amazônia Ocidental Brasileira (MINA-Brasil) – investigamos a malária na infância, na cidade de Cruzeiro do Sul, no Acre, uma das regiões de maior endemicidade para a doença da Amazônia Brasileira. Investigamos os fatores associados com infecção e doença bem como as implicações da malária para o nível de hemoglobina aos dois anos de idade. Identificamos os casos de malária diagnosticados ao longo dos primeiros dois anos de vida da população deste estudo através do cruzamento do banco de dados do projeto MINA-Brasil com o banco de dados do sistema de notificação de malária SIVEP-Malária. A prevalência de período de malária entre as crianças deste estudo foi de 7,1% ($n = 110/1539$) – sendo que 89,0% dos casos de malária diagnosticados foram de malária vivax. Entre as crianças que tiveram malária notificada, episódios repetidos foram comuns: 53,6% tiveram mais de um episódio notificado e 19,1% tiveram ≥ 4 episódios notificados. Usamos sorologia para identificar exposições prévias ao *P. vivax* nos primeiros dois anos de vida independentemente de terem sido notificadas no sistema SIVEP-Malária. Vimos que nos primeiros dois anos de vida 5,3% ($n = 23/435$) das crianças avaliadas tiveram evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* – definida como positividade para ≥ 2 antígenos da fase sanguínea de *P. vivax* em amostras coletadas aos $\cong 12$ ou $\cong 24$ meses de idade. Observamos que parte importante das infecções por *P. vivax* nos primeiros dois anos de vida não é diagnosticada, o que indica subnotificação de infecções por *P. vivax* no início da vida. Vimos que as crianças que foram expostas à malária na vida intrauterina tiveram maior risco de infecção por *P. vivax* nos primeiros dois anos de vida (notificação de malária vivax: razão da taxa de incidência ajustada 2,52 IC 95% 1,36 - 4,66, $P = 0,003$; infecção prévia por *P. vivax* identificada por sorologia: razão de prevalência [PR] ajustada 2,61 IC 95% 1,27 - 5,36 $P = 0,009$). O aleitamento materno por ≥ 12 meses foi fator de proteção importante contra evidência sorológica de ao menos uma infecção prévia por *P. vivax* nos primeiros dois anos de vida (PR ajustada 0,20 IC 95% 0,13 - 0,31 $P = <0,001$). A notificação de malária nos primeiros 24 meses de vida se associou com aumento de risco de anemia aos dois anos de idade (PR ajustada de 1,81 IC 95% 1,03 - 3,18, $P = 0,041$); episódios repetidos de malária tiveram efeito negativo mais pronunciado (PR ajustada 2,39 IC 95% 1,28 - 4,44, $P = 0,006$). Observamos associação entre notificação de malária vivax e aumento de risco de anemia aos dois anos de idade nos casos de episódios recentes (diagnosticados nos 12 meses prévios à medição do nível de hemoglobina), ou nos casos repetidos (≥ 2 notificações de malária vivax). Os resultados deste estudo apontam para efeito negativo cumulativo da malária no início da vida de crianças da Amazônia brasileira, e reforçam a importância da promoção do aleitamento materno.

Palavras-chave: Malária na infância; *Plasmodium vivax*; Amazônia.

ABSTRACT

PINCELLI, Anaclara. **Malaria during the first two years of the life of children in Amazonian Brazil: associated factors and risk of anemia at two years of age.** 2023. 105p. Thesis (Ph.D. in Science) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

In this cohort study – nested within the Maternal and Child Health and Nutrition in Acre, Brazil (MINA-Brazil) study – we investigated malaria in early infancy in the main malaria transmission hotspot of Amazonian Brazil. We investigated factors associated with infection and disease from birth until the age of 2 years and the clinical impact of malaria for hemoglobin levels at the age of 2 years. We identified malaria cases during the first two years of age of the study population in the electronic database of the Ministry of Health of Brazil (SIVEP-Malaria) for malaria case notifications. The cumulative prevalence of malaria was 7.1% (n = 110/1539) – 89.0% of the infections were caused by *P. vivax*. Few (1.4%) children experienced ≥ 4 infections during the 2-year follow-up, accounting for 43.4% of the overall malaria burden among study participants. We used serology to identify prior exposures to *P. vivax* in the first two years of life regardless of the malaria notification. Overall, 5.3% (n = 23/435) of the children evaluated had serological evidence of previous *P. vivax* infection – defined as positivity for *P. vivax* ≥ 2 blood phase antigens in samples collected at $\cong 12$ or $\cong 24$ months of age. Most (65.2%) children with serologically defined *P. vivax* infection had no clinical vivax malaria episode notified and treated with antimalarials during their first two years of life. Children born to mothers who had one or more infections during pregnancy are at an elevated risk of *P. vivax* infection in their early life (reporting of vivax malaria: adjusted IRR 2.52 CI 95% 1.36 - 4.66, P = 0.003; *P. vivax* infection identified by serology: adjusted PR 2.61 95% CI 1.27 - 5.36 P = 0.009). We identified prolonged breastfeeding (total breastfeeding duration ≥ 12 months) as a predictor of decreased risk of blood-stage *P. vivax* infection over the first two years of life (adjusted PR 0.20 CI 95% 0.13 - 0.31 P = <0.001), although not of decreased risk of notified clinical vivax malaria. Malaria in the first 24 months of life was associated with an increased risk of anemia at two years of age (adjusted PR 1.81, 95% CI 1.03 - 3.18, P = 0.041); repeated episodes of malaria had a more pronounced negative effect (adjusted PR 2.39 95% CI 1.28 - 4.44, P = 0.006). Recent and repeated vivax malaria episodes in early childhood are associated with increased risk of anemia at the age of 2 years. The results of this study indicate a cumulative impact of *P. vivax* infections in infants and toddlers exposed to relatively low levels of malaria transmission in the Brazilian Amazon and reinforce the importance of promoting breastfeeding.

Keywords: Malária during infancy; *Plasmodium vivax*; Amazon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estimativa de incidência global de malária vivax e falciparum no ano de 2017	23
Figura 2 Transporte transplacentário de anticorpos IgG maternos mediado por receptores Fc neonatais (FcRn).....	29
Figura 3 Representação esquemática do acompanhamento e avaliações realizadas pelo estudo MINA-Brasil	36
Figura 4 Município de Cruzeiro no mapa	38
Figura 5 Taxa de mortalidade infantil e notificação de malária no Brasil e em Cruzeiro do Sul	39
Figura 6 Modelos conceituais hierárquicos para investigação de notificação de malária no sistema SIVEP-Malária nos primeiros dois anos de vida - como desfecho e como exposição	47
Figura 7 Modelos conceituais hierárquicos para investigação de evidência sorológica de infecção prévia por <i>P. vivax</i> - como desfecho e como exposição	48
Figura 8 Fluxograma do estudo.....	54
Figura 9 Incidência de casos de malária infantil e materna notificados nos primeiros 24 meses pós-parto.....	61
Figura 10 Proporção de crianças com anticorpos IgG anti-PvAMA1, anti-PvDBP e anti-PvMSP119 detectados nas visitas de um ano e dois anos de idade	64
Figura 11 Distribuição de crianças de acordo com ausência ou presença de anticorpos IgG para 1 ou ≥ 2 antígenos da fase sanguínea de <i>Plasmodium vivax</i> (PvAMA1, PvDBP ou PvMSP119)	65
Figura 12 Crianças que participaram da avaliação sorológica e tiveram exposições ao <i>Plasmodium vivax</i> identificadas por sorologia ou notificação no sistema SIVEP-Malária.....	67
Figura 13 Incidência de casos de malária de acordo com a região de moradia.....	68
Figura 14 Anticorpos IgG anti-PvDBP, anti-PvMSP119 e anti-PvAMA1 nas parturientes deste estudo e risco subsequente de diagnóstico de malária vivax (n = 1095; amostras coletadas no parto)	72
Figura 15 Anticorpos IgG maternos anti-PvDBP, anti-PvMSP119 e anti-PvAMA1 e risco subsequente de diagnóstico de malária vivax (n = 1095)	75

Figura 16 Notificação de malária e anemia aos dois anos de idade - nível de hemoglobina <110g/L (n = 860)	82
Figura 17 Evidência sorológica de exposição prévia ao <i>Plasmodium vivax</i> e anemia aos dois anos de idade - nível de hemoglobina <110g/L (n = 428)	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comparação entre a população que participou (n = 860) e que não participou da análise de anemia aos dois anos de idade mas foi autorizada a participar do estudo MINA-Brasil (n = 691, incluindo 305 crianças residentes na região rural, n = 386 somente residentes na área urbana ou periurbana de Cruzeiro do Sul)	56
Tabela 2 Comparação entre a população que participou (n = 435) e que não participou da avaliação sorológica para identificação de exposições prévias ao <i>P. vivax</i> mas foi autorizada a participar do estudo MINA-Brasil (n = 1116, incluindo 305 crianças residentes na região rural, n = 811 somente residentes na área urbana ou periurbana de Cruzeiro do Sul).....	58
Tabela 3 Regressão binomial negativa multinível para avaliação de fatores associados com o número de notificações de malária e malária vivax em específico nos primeiros 24 meses de vida (n = 1494).....	69
Tabela 4 Regressão binomial negativa para avaliação de fatores associados com o número de notificações de malária e malária vivax em específico nos primeiros 24 meses de vida (n = 1494)	70
Tabela 5 Regressão de riscos proporcionais de Cox para primeiro caso de notificação de malária vivax nas mães dos participantes deste estudo no primeiro e no segundo ano pós-parto (n = 1095)	73
Tabela 6 Regressão de riscos proporcionais de Cox para primeiro caso de notificação de malária vivax nos primeiros 24 meses de vida (n = 1095).....	76
Tabela 7 Regressão multinível de Poisson com variância robusta para investigação de fatores associados com a presença de anticorpos IgG para ≥ 2 antígenos da fase sanguínea de <i>P. vivax</i> em crianças com 1 ou 2 anos de idade (n = 431) - desfecho binário positivo/negativo	78
Tabela 8 Regressão multinível de Poisson com variância robusta para investigação de fatores associados com ao menos um caso de malária vivax notificado nos primeiros 24 meses de vida (n = 431) - desfecho binário positivo/negativo.....	79
Tabela 9 Regressão multinível de Poisson com variância robusta para investigação de fatores associados com a presença de anticorpos IgG para ≥ 1 antígenos da fase sanguínea de <i>P. vivax</i> em crianças com 1 ou 2 anos de idade (n = 431) - desfecho binário positivo/negativo	80

Tabela 10 Regressão multinível de Poisson com variância robusta para avaliação de associação entre notificação de malária nos primeiros 24 meses de vida e risco de anemia aos dois anos de idade (n = 860) - desfecho binário com anemia/sem anemia	82
Tabela 11 Regressão quantílica ajustada para investigação de associação entre notificação de malária nos primeiros 24 meses de vida e risco de anemia aos dois anos de idade (n = 860) - Intervalo de Confiança 95% de <i>bootstrap</i> calculado a partir de 500 repetições	83
Tabela 12 Regressão multinível de Poisson com variância robusta para avaliação de associação entre evidência sorológica de infecção prévia por <i>P. vivax</i> e risco de anemia aos dois anos de idade (n = 428) - desfecho binário com anemia/sem anemia.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

SIVEP-Malária	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica – Malária
ADCI	<i>Antibody-dependent cell inhibition</i>
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CBMCs	Células mononucleares do sangue de cordão umbilical
CSA	<i>Chondroitin sulfate A</i>
DP	Desvio padrao
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FcRn	Receptores Fc neonatais
Fcy	Receptor Fc gama
HbF	Hemoglobinas fetais
IC	Intervalo de Confiança
IDHM	Índice de Desenvolvimento Humano Municipal
Ig	Imunoglobulina
IL-10	Interleucina 10
IPA	Incidência Parasitária Anual
IPTp	<i>Intermittent Preventive Treatment in Pregnancy</i>
IPTp-DP	IPTp com dihidroartemisinina-piperaquina
IPTp-SP	IPTp com sulfadoxina-pirimetamina
IR	Índice de reatividade
IRR	<i>Incidence Rate Ratio</i>
	Materno-Infantil no Acre: coorte de nascimentos da Amazônia Ocidental
MINA-Brasil	Brasileira
MOS	<i>Medical Outcomes Study</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
pABA	Ácido 4-aminobenzóico
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão salino fosfatado
PfEMP-1	<i>P. falciparum erythrocyte membrane protein-1</i>
PR	<i>Prevalence Ratio</i>
PvAMA1	<i>P. vivax Apical Membrane Antigen 1</i>
PvDBP	<i>P. vivax Duffy binding protein</i>
PvMSP119	<i>P. vivax 19 kDa C-terminal region of the merozoite surface protein 1</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Th1	Linfócito T auxiliador (<i>helper</i>) Th1
TMB	Tetrametilbenzidina
UFAC	Universidade Federal do Acre
USP	Universidade de São Paulo
INTERGROWTH-21st	<i>International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century</i>

VAR2CSA	<i>Variant surface antigen 2-chondroitin sulfate A</i>
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
=	Igual
χ^2	Qui-quadrado
dl	Decilitro
g	Grama
kg	Quilograma
km	Quilômetro
mg	Miligrama
ml	Mililitro
μ l	Microlitro
n	Número
P	Valor-p - probabilidade de significância
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	MALÁRIA.....	22
1.1.1	Malária na infância	24
1.1.1.1	<i>Malária placentária e fenótipo imunotolerante para <i>P. falciparum</i> após o nascimento.....</i>	<i>25</i>
1.1.1.2	<i>Proteção contra malária falciparum nos primeiros seis meses de vida.....</i>	<i>28</i>
1.1.2	Aleitamento materno	30
1.2	ESTE ESTUDO.....	31
2	OBJETIVOS.....	32
3	METODOLOGIA.....	33
3.1	DELINEAMENTO	33
3.1.1	O estudo MINA-Brasil	33
3.1.1.1	<i>Acompanhamento de gestantes residentes na região urbana de Cruzeiro do Sul ..</i>	<i>34</i>
3.1.1.2	<i>Parturientes na maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá</i>	<i>34</i>
3.1.1.3	<i>Acompanhamento dos nascidos vivos residentes na região urbana e periurbana de Cruzeiro do Sul.....</i>	<i>35</i>
3.1.2	Área de estudo	37
3.1.2.1	<i>Diagnóstico e notificação de malária na Amazônia Brasileira</i>	<i>39</i>
3.1.3	População do estudo	40
3.1.3.1	<i>Histórico de malária na gestação.....</i>	<i>41</i>
3.1.3.2	<i>Práticas de aleitamento materno no primeiro mês de vida</i>	<i>42</i>
3.2	CASOS DE MALÁRIA NOTIFICADOS NOS PRIMEIROS 24 MESES PÓS-PARTO	42
3.3	SOROLOGIA	43
3.4	ANÁLISES	44
3.4.1	Fatores associados com notificação de malária nos primeiros dois anos de vida	48
3.4.2	Sorologia de amostras coletadas no parto e análise de sobrevivência.....	49
3.4.3	Fatores associados com evidência sorológica de infecção prévia por <i>P. vivax</i> aos dois anos.....	50
3.4.4	Infecção por <i>Plasmodium</i> e anemia aos dois anos de idade	50
3.4.5	Gráficos	51

3.5	GLOSSÁRIO	52
3.6	ASPECTOS ÉTICOS.....	52
4	RESULTADOS	53
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO	53
4.1.1	Perdas: comparação entre as crianças que participaram e que não participaram das análises de anemia aos dois anos de idade e da avaliação sorológica por residirem na região rural, por perda de seguimento, por recusas ou por indisponibilidade de amostra sanguínea	55
4.2	INFECÇÕES POR <i>PLASMODIUM</i> AO LONGO DOS PRIMEIROS DOIS ANOS DE VIDA	60
4.2.1	Casos de malária notificados no sistema SIVEP-Malária	60
4.2.2	Identificação de exposições prévias às fases sanguíneas de <i>P. vivax</i> por sorologia.....	61
4.2.2.1	<i>Evidência sorológica de infecção prévia por <i>P. vivax</i>.....</i>	<i>66</i>
4.3	FATORES ASSOCIADOS COM INFECÇÕES POR <i>PLASMODIUM</i> NOS PRIMEIROS DOIS ANOS DE VIDA	67
4.3.1	Fatores associados com notificação de malária no sistema SIVEP-Malária	67
4.3.2	Anticorpos maternos adquiridos na vida intrauterina: um possível fator protetor contra malária vivax no início da vida	70
4.3.2.1	<i>Anticorpos contra antígenos das fases sanguíneas de <i>P. vivax</i> e risco de malária vivax materna nos primeiros 24 meses pós-parto.....</i>	<i>71</i>
4.3.2.2	<i>Anticorpos maternos contra antígenos das fases sanguíneas de <i>P. vivax</i> adquiridos na vida intrauterina e risco de malária vivax nos primeiros 24 meses de vida</i>	<i>74</i>
4.3.3	Fatores associados com evidência sorológica de exposição às fases sanguínea de <i>P. vivax</i>.....	76
4.4	INFECÇÕES POR <i>PLASMODIUM</i> E ANEMIA AOS DOIS ANOS DE IDADE	80
4.4.1	Notificação de malária no sistema SIVEP-Malária e risco de anemia aos dois anos de idade.....	81
4.4.2	Evidência sorológica de exposição prévia ao <i>P. vivax</i> e risco de anemia aos dois anos de idade	83
5	DISCUSSÃO	86
5.1	INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i> NOS PRIMEIROS DOIS ANOS DA VIDA DE CRIANÇAS DA COORTE MINA-BRASIL	86

5.1.1	Ocorrência	86
5.1.2	Fatores associados.....	88
<i>5.1.2.1</i>	<i>Exposição à malária na vida intrauterina.....</i>	<i>88</i>
<i>5.1.2.2</i>	<i>Aleitamento materno</i>	<i>88</i>
<i>5.1.2.3</i>	<i>Baixa incidência de malária vivax no primeiro ano de vida.....</i>	<i>89</i>
5.1.3	Anemia	90
5.2	LIMITAÇÕES.....	92
6	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	106
	ANEXO – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

A malária permanece como uma das principais doenças infecciosas do mundo.

A malária é uma doença vetorial; a infecção de seres humanos acontece durante o repasto sanguíneo de mosquitos fêmea do gênero *Anopheles* infectados com parasitos do gênero *Plasmodium*. Enquanto o mosquito se alimenta, esporozoítos são inoculados no tecido subcutâneo humano. Começa, então, a fase pré-eritrocitária da infecção, um período silencioso ao hospedeiro, quando ainda não há manifestação de sintomas clínicos. Parte dos parasitos inoculados chegam na corrente sanguínea, alcançam o fígado, atravessam hepatócitos e ali se estabelecem. Por aproximadamente 7 a 10 dias os parasitos se desenvolvem nos hepatócitos, até que depois de várias replicações mitóticas são liberados milhares de merozoítos na corrente sanguínea. Os merozoítos invadem hemácias, se multiplicam e originam mais merozoítos. A hemácia, agora cheia de merozoítos maduros, se rompe e novos parasitos são liberados na circulação; começa um novo ciclo de invasão de hemácias. Nesse momento, na fase sanguínea da infecção, os sintomas clínicos da malária podem aparecer. Nas hemácias, os merozoítos podem dar origem a novos merozoítos ou a gametócitos, a forma de vida do parasito que pode infectar o vetor e dar continuidade ao ciclo da malária (1,2).

Seis espécies de *Plasmodium* parasitam seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale curtisii*, *P. ovale wallikeri*, e *P. malariae* (2). Entre os seis, *P. falciparum* e *P. vivax* são os principais responsáveis pela carga de malária em humanos.

P. falciparum e *P. vivax* possuem suas especificidades. *P. falciparum* é a espécie predominante no continente africano (Figura 1), está associado a formas mais graves da malária, à facilidade de desenvolvimento de resistência aos antimaláricos, e é o agente etiológico responsável pela maior parte das mortes por malária no mundo (3). *P. vivax* possui distribuição mais ampla (Figura 1), é a espécie predominante nas Américas e, ainda que em menor escala que *P. falciparum*, também pode provocar malária grave e desenvolver resistência aos antimaláricos (4,5). Durante seu ciclo biológico, *P. vivax* pode desenvolver formas dormentes intra-hepáticas, os hipnozoítos, que podem provocar episódios repetidos

de malária a partir de uma única infecção primária. Além de terem impacto na saúde do hospedeiro e tornarem a história natural da malária vivax mais complexa, os hipnozoítos são um desafio para o controle da malária vivax (6–8).

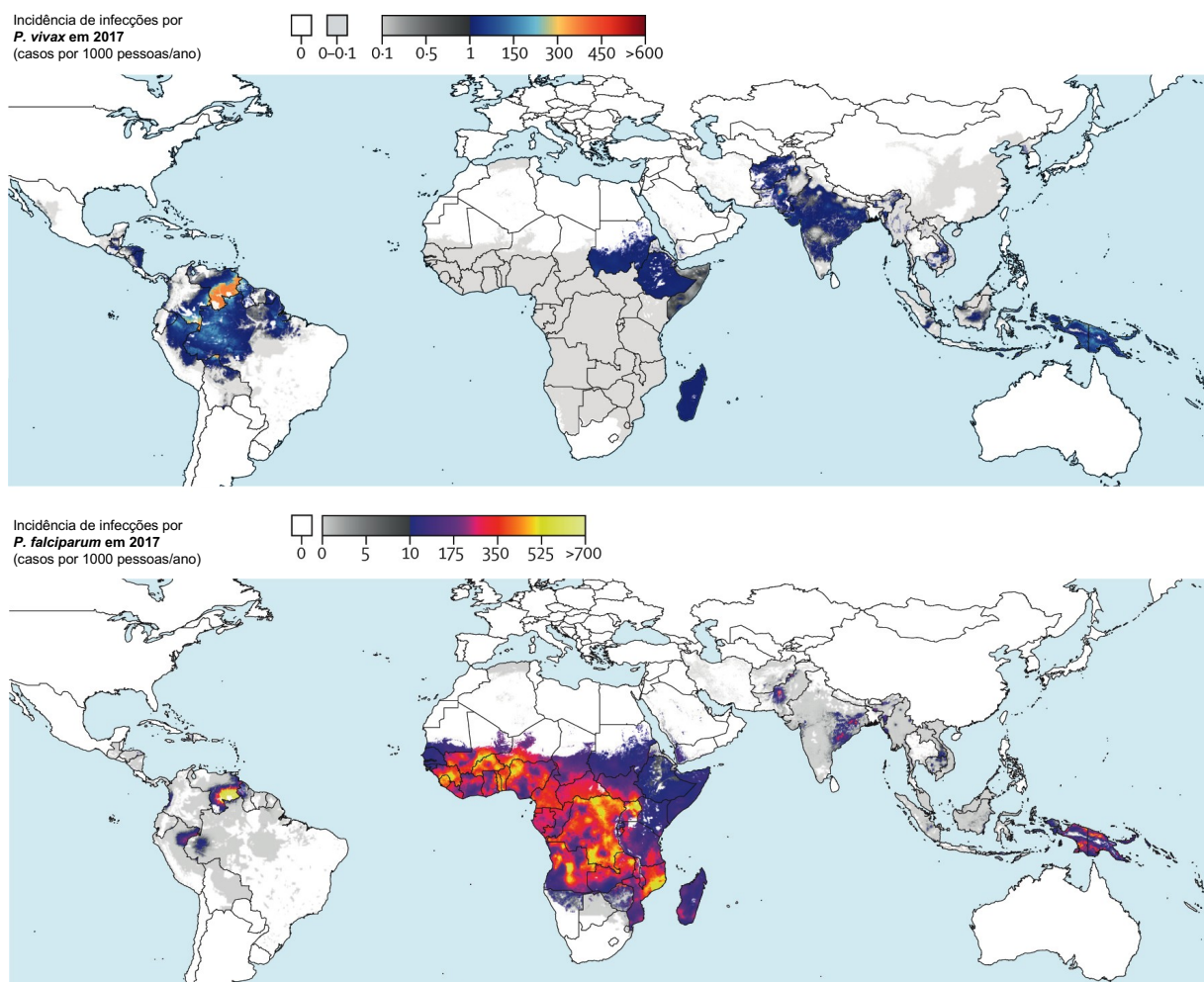


Figura 1 Estimativa de incidência global de malária vivax e falciparum no ano de 2017
Número de casos por 1000 pessoas/ano. Adaptado de Battle et al. 2019 e Weiss et al. 2019.

Apesar da malária ser um dos grandes problemas de saúde da atualidade, essa é uma doença milenar, com via de transmissão conhecida e documentada desde 1897 (9). A virulência de *P. falciparum* é reconhecida há muitos anos; *P. vivax*, por outro lado, foi reconhecido como um problema de saúde pela comunidade científica somente no século XXI (4,7,10). Além de ter sido considerada uma espécie benigna por anos, a cultura *in vitro* de *P. vivax* a longo termo ainda não foi estabelecida, o que dificulta o entendimento dessa espécie. Assim, muito da biologia da malária vivax permanece desconhecido.

1.1.1 Malária na infância

Crianças no início da vida são particularmente vulneráveis às formas mais graves da malária: mais da metade das mortes por malária no mundo são em crianças menores de 5 anos (7,11,12). Após repetidas infecções por *Plasmodium*, é possível o desenvolvimento de imunidade clínica, que não previne a infecção, mas consegue limitar a parasitemia, o agravamento da doença e a manifestação de sintomas (13,14). Crianças no início da vida não tiveram exposições ao parasito suficientes para desenvolver imunidade e são mais vulneráveis às complicações da malária, entre elas anemia e anemia grave (15–17).

Durante o ciclo de vida de *Plasmodium*, acontece a invasão de hemácias e destruição dessas células quando merozoítos são liberados na corrente sanguínea, o que contribui para o desenvolvimento de anemia, um dos principais desdobramentos clínicos da malária. Mas durante a infecção, a maior parte das hemácias destruídas são destruídas pelo sistema imune do hospedeiro sem nunca terem sido infectadas por *Plasmodium* (18,19). Enquanto *P. falciparum* invade hemácias de todas as idades, *P. vivax* invade somente reticulócitos – hemácias muito jovens e raras na circulação sanguínea, que correspondem, em adultos, a aproximadamente 1% das hemácias circulantes. A exclusividade por reticulócitos limita os níveis de parasitemia, que costumam ser mais baixos em infecções por *P. vivax* do que em infecções por *P. falciparum* (2). Mas a destruição de hemácias não infectadas na malária vivax é proporcionalmente maior do que na malária falciparum, e mesmo com diferenças nos níveis de parasitemia, a massa de hemácias perdidas na malária vivax e na malária falciparum é comparável (20). Além da destruição de hemácias, a infecção por *Plasmodium* pode provocar menor produção de reticulócitos pela medula óssea (21). As recaídas de *P. vivax* são um risco adicional: contribuem para prolongar e agravar a anemia associada à malária (7,16,17,20).

A taxa de mortalidade global por malária em crianças menores de cinco anos reduziu de 5,9 (5,5 - 6,4) mortes a cada 1000 nascidos vivos no ano 2000 para 3,0 (2,4 - 3,6) mortes a cada 1000 nascidos vivos no ano de 2019 (22). A diminuição na taxa de mortalidade por malária não foi homogênea em todas as regiões endêmicas. Nos países com as mais altas taxas de mortalidade infantil ao longo dos primeiros cinco anos de vida (≥ 75 mortes a cada 1000 nascidos vivos), a malária falciparum segue sendo uma das principais causas de morte nessa faixa etária. No Sudão do Sul, Congo, Libéria, Mali, Benim, Lesoto, Burkina Faso, Guiné

Equatorial, Guiné-Bissau, Níger e Costa do Marfim, a malária falciparum é a principal causa de morte em crianças menores de cinco anos (22).

P. falciparum é o grande responsável por mortes por malária no mundo. Mas no Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental, em regiões endêmicas para *P. vivax* e para *P. falciparum*, o impacto da malária vivax para a saúde no início da vida é expressivo e extrapola o impacto da malária falciparum (16,17,23,24). Nessas regiões, o pico de incidência de malária vivax acontece em idade inferior ao pico de malária falciparum (16,23,25–27), sugerindo que a aquisição de imunidade contra *P. vivax* acontece mais cedo. Em estudo de vigilância hospitalar em Papua, na Indonésia, entre os pacientes diagnosticados com malária, *P. vivax* foi a espécie mais prevalente nos primeiros três anos de vida e principal responsável por anemia grave no início da vida; a partir dos 3 anos, *P. falciparum* passou a ser a espécie mais prevalente (17). Nas Américas, onde aproximadamente 75% dos casos de malária são provocados por *P. vivax* (28), a epidemiologia da malária na infância é pouco conhecida.

1.1.1.1 Malária placentária e fenótipo imunotolerante para *P. falciparum* após o nascimento

A malária na gestação está associada com anemia materna, com aumento de risco de aborto, prematuridade, natimortalidade, baixo peso ao nascer e aumento da mortalidade materna e neonatal (7,29–31). Em gestantes, a malária falciparum pode se agravar para malária placentária. Faz parte da biologia de *P. falciparum* a expressão de proteínas (proteína 1 da membrana do eritrócito – PfEMP-1) que são transportadas para a superfície das hemácias parasitadas e possibilitam a citoaderência dessas hemácias em tecidos do hospedeiro. No caso da malária placentária, hemácias parasitadas por *P. falciparum* com a proteína VAR2CSA em sua superfície, se aderem a receptores de sulfato de condroitina A (CSA) presentes no sinciotrofoblasto (32). O sequestro de hemácias parasitadas na placenta acontece independentemente da imunidade clínica contra malária falciparum adquirida ao longo da vida; mas multigestas, quando expostas à malária placentária em gestações anteriores, podem desenvolver um repertório de anticorpos contra antígenos de VAR2CSA protetor contra esse desenvolvimento da doença (33–36). A malária placentária, além de estar associada com piora nos desfechos gestacionais, foi associada com aumento de risco de infecção por *P. falciparum* nos primeiros anos de vida (37–41).

Em estudo realizado em Benim, foi observado aumento de risco de infecção sintomática por *P. falciparum* em crianças de 18 e 24 meses de idade expostas à malária placentária na vida intrauterina (n = 27) quando comparadas com filhos de mães livres de malária placentária no parto (razão da taxa de incidência [IRR/*Incidence Rate Ratio*] ajustado 1,5, intervalo de confiança [IC] 95% 1,0 - 2,3, P = 0,04); não foi observada diferença no risco de infecção assintomática (38). Resultados parecidos foram encontrados em estudo com população do Malawi, onde também foi observado aumento de risco para malária ao longo dos primeiros dois anos de vida em crianças expostas à malária placentária (razão de odds [OR/*Odds Ratio*] ajustada 3,9 IC 95% 1,2 - 13,0, P = 0,03) quando comparadas com crianças sem essa exposição identificada (39).

Andronescu et al. 2021, investigaram a associação entre malária placentária e tratamento intermitente preventivo da malária durante a gestação (IPTp) – com dihidroartemisinina-piperaquina (IPTp-DP), que oferece maior proteção contra malária placentária, e sulfadoxina-pirimetamina (IPTp-SP) – e o risco de malária falciparum ao longo dos primeiros 24 meses de vida de crianças do Malawi. Os autores não observaram associação entre diagnóstico de malária placentária no parto ou esquema de IPTp e risco de infecção por *P. falciparum* ou malária falciparum clínica na infância, e sugeriram que associações entre esquema de IPTp e risco de malária na infância sejam principalmente decorrentes de fatores ambientais e não da exposição à malária placentária (42).

A associação entre exposição à malária placentária durante a vida intrauterina e aumento de risco de malária após o nascimento dificilmente será livre de confundidores porque as condições ambientais, que costumam ser determinantes para o risco de malária, vivenciadas pela mãe ao longo da gestação e pela criança no início da vida, muitas vezes são compartilhadas. Mas além das associações epidemiológicas, foram observadas diferenças na resposta imunológica contra o parasito em crianças que foram expostas à malária placentária quando comparadas a crianças sem essa exposição. Alterações na resposta imunológica vão ao encontro do que foi observado em estudos epidemiológicos, e sugerem que a exposição a antígenos de *Plasmodium* ou a eritrócitos infectados durante a vida intrauterina pode provocar fenótipo imunotolerante para a malária após o nascimento (37,38,43).

Malhotra et al. 2009 observaram em estudo de coorte no Quênia que parte das crianças expostas à malária placentária desenvolveram perfil imunotolerante para *P.*

falciparum. O perfil imunotolerante se caracterizou por maior risco de infecção por *P. falciparum* nos primeiros três anos de vida e presença de células mononucleares do sangue de cordão umbilical (CBMCs) e periférico (PBMCs) que, ao terem contato com antígenos da fase sanguínea de *P. falciparum*, tiveram menor produção de citocinas características de Th1 e maior produção de IL-10, quando comparadas com CBMCs e PBMCs de crianças não expostas à malária placentária. Os autores sugerem que a exposição a antígenos de *P. falciparum* na vida intrauterina pode modular as células T de forma que não reconheçam antígenos de *P. falciparum* como não próprios, perfil que pode se manter nos primeiros anos de vida (37).

Dechavanne et al. 2022 observaram alterações na população de monócitos de crianças expostas – menor frequência de monócitos não clássicos (CD14+ CD16+) (38). A exposição à malária placentária foi associada, ainda, a níveis mais baixos de anticorpos IgG contra antígenos de *P. falciparum* nos primeiros dois anos de vida (38,44). Além de fazerem apresentação de antígenos, fagocitose e produzirem citocinas, os monócitos podem contribuir para redução da parasitemia através da liberação de fatores solúveis que inibem o desenvolvimento de parasitos intraeritrocitários, processo chamado *Antibody-dependent cell inhibition* (ADCI). Nesse processo, receptores Fcγ expressos nos monócitos reconhecem a porção Fc de anticorpos IgG1 e IgG3 ligados a merozoítos opsonizados, o que estimula os monócitos a produzirem fatores solúveis que inibem o desenvolvimento de formas intraeritrocitárias de *P. falciparum* (45,46). Dechavanne et al. 2022 levantam a hipótese de que a exposição a antígenos de *P. falciparum* na vida intrauterina pode estar associada com modulação de precursores de monócitos, contribuindo para tolerância a infecções por esse parasito na infância.

Não é conhecido se a exposição a antígenos de *P. vivax* na vida intrauterina está associada com aumento do risco de malária na infância, mas é reconhecido que a malária vivax ao longo da gestação pode afetar a saúde placentária. A malária vivax na gestação foi associada com aumento da espessura da barreira placentária e aumento do número de células mononucleares na placenta, condições que indicam inflamação e que podem prejudicar a passagem de nutrientes e oxigênio para o feto (47–49). Além disso, a malária gestacional, tanto vivax como falciparum, pode evoluir para malária congênita quando há transmissão vertical de *Plasmodium* – caracterizada pela presença de estágios sanguíneos do parasito no sangue de cordão umbilical ou no sangue periférico do neonato (50–52). As

possíveis implicações da malária congênita no desenvolvimento da reposta imunológica contra o parasito na infância, ainda não são conhecidas.

1.1.1.2 Proteção contra malária falciparum nos primeiros seis meses de vida

Crianças nos primeiros cinco anos de vida são um grupo especialmente suscetível às complicações da malária; mas nos primeiros meses de vida parecem estar protegidas da malária falciparum (53).

Até os seis meses de idade as infecções por *P. falciparum* costumam não se agravar e as parasitemias costumam ser relativamente baixas (54–57). A proteção contra a malária falciparum no início da vida pós-natal foi observada em diferentes estudos epidemiológicos, mas os mecanismos biológicos responsáveis por essa imunidade permanecem pouco conhecidos. O caráter predominantemente subclínico da malária falciparum nos primeiros meses de vida pode estar associado com: (a) presença de hemoglobinas fetais (HbF), que possivelmente não favorecem o desenvolvimento do parasito (58,59); (b) carência de pABA (ácido 4-aminobenzóico) no leite materno, nutriente essencial para a replicação parasitária; (c) menor exposição aos vetores; (d) anticorpos de origem materna adquiridos na vida intrauterina (60,61). Apesar dos anticorpos adquiridos na vida intrauterina serem tradicionalmente associados com proteção à malária no início da vida, poucos estudos associaram os níveis de anticorpos maternos com a diminuição do risco subsequente da doença (62,63). Há estudos que indicam que esses anticorpos sejam principalmente marcadores de risco de infecção, e que não tenham capacidade de proteção contra malária falciparum (64,65).

Durante a vida intrauterina, principalmente no terceiro trimestre de gestação, anticorpos IgG maternos são ativamente transportados para o feto (66,67). Esse processo é mediado por receptores Fc neonatais (FcRn) expressos no sinciotrofoblasto e específicos para anticorpos do tipo IgG (68) (Figura 2). Em uma gestação saudável o transporte pode ser tão eficiente que o nível de anticorpos IgG em recém-nascidos a termo pode ser maior do que o nível materno (67). Estudos recentes sugerem a passagem transplacentária de IgE (69), mas a via de transporte desses anticorpos da mãe para o feto ainda não está clara (70). A passagem transplacentária de anticorpos IgG maternos contra antígenos de *Plasmodium* acontece mesmo em regiões de relativa baixa transmissão de malária, onde há cocirculação

de *P. falciparum* e *P. vivax*, e onde o tratamento da doença é efetivo (71). A passagem transplacentária de anticorpos está positivamente associada com o estado de saúde materno e placentário. Infecções como a malária podem diminuir a eficiência da passagem de anticorpos maternos para o feto (72–74). Além disso, porque o transporte de anticorpos acontece principalmente no terceiro trimestre de gestação, a prematuridade, que também é ocorrência associada à malária na gestação (75), pode impactar negativamente o nível de anticorpos no nascimento (67,76).

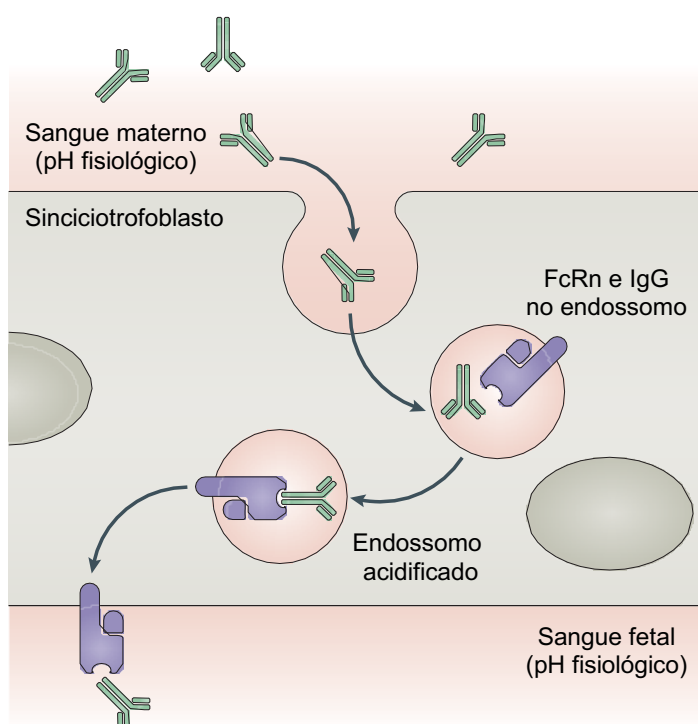


Figura 2 Transporte transplacentário de anticorpos IgG maternos mediado por receptores Fc neonatais (FcRn) No sinciotrofoblasto, através de pinocitose, vesículas capturam fluidos maternos contendo IgG. O pH acidificado do endossomo possibilita a ligação entre a porção Fc de anticorpos IgG maternos e receptores FcRn – uma ligação de alta afinidade em $\text{pH} < 6,5$ que impede a degradação dos anticorpos. A vesícula endossomal se funde na face fetal do sinciotrofoblasto e expõe o complexo FcRn+IgG ao pH fisiológico ($\text{pH} = 7,4$), provocando a dissociação da ligação e liberação de anticorpos IgG maternos na circulação fetal. A eficiência desse transporte depende da subclasse de anticorpos; em ordem decrescente de eficiência: IgG1, IgG4, IgG3 e IgG2 (77). Adaptado de Roopenian e Akilesh 2007.

A proteção contra a malária vivax nos primeiros seis meses de vida é uma questão ainda não resolvida. Em regiões endêmicas para *P. vivax* e *P. falciparum* do Sudeste Asiático, *P. vivax* é a espécie mais prevalente e responsável por maior morbidade por malária no início da vida (17,24,27). Em estudo realizado em Papua, crianças menores de três meses de idade infectadas com *P. vivax* tiveram maior chance de desenvolver anemia grave

(concentração de hemoglobina <5 g/dL), do que crianças da mesma idade infectadas com *P. falciparum* (OR 2,4 IC 95% 1,03 - 5,91, P = 0,041) (24). Douglas et al. 2013 sugerem que a maior proporção de reticulócitos na circulação de crianças menores de três meses pode estar associada com suscetibilidade à infecção por *P. vivax* no início da vida (78).

1.1.2 Aleitamento materno

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que os bebês recebam somente leite materno durante os primeiros seis meses de vida, e que o aleitamento materno seja mantido até pelo menos os dois anos de idade (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259386/9789241550086-eng.pdf>).

O aleitamento materno diminui a mortalidade e morbidade de diversas doenças infecciosas na infância – entre elas, diarreia, pneumonia, sepse e meningite (79–81). Favorece, ainda, o alinhamento correto dos dentes, o desenvolvimento da inteligência, e foi associado com redução de risco de sobrepeso e diabetes (80). Além de contribuir para saúde infantil, mães que amamentam têm menor risco de desenvolver câncer de mama e, possivelmente, menor risco de desenvolver diabetes e câncer de ovário (80,82). Victora et al. 2016 destacam que a amamentação é essencial para construção de um mundo melhor para as futuras gerações tanto em países pobres como em países ricos, e que muitas mortes na infância poderiam ser evitadas se a amamentação no início da vida fosse universal.

Através da amamentação a criança recebe elementos que contribuem para construção e regulação de sua imunidade – anticorpos (principalmente IgA, mas também IgM e IgG), citocinas, hormônios, lactoferrina, oligossacarídeos, entre outros (83,84). Bactérias presentes no leite e na mama, e a composição do leite materno, contribuem para colonização e manutenção da microbiota intestinal da criança amamentada (85,86). Os estudos que investigam a associação entre malária e a microbiota do hospedeiro ainda são poucos, mas já foi sugerido que a microbiota intestinal esteja associada com a evolução clínica da infecção por *Plasmodium* (87). Além de nutrientes, bactérias e compostos bioativos, é possível que antígenos, incluindo antígenos de *Plasmodium*, presentes no leite materno estejam associados com desenvolvimento de resposta imune infantil contra patógenos (88,89).

Os estudos que investigaram a associação entre amamentação e o risco de malária na infância foram realizados no continente Africano em regiões endêmicas para *P. falciparum*. Em estudo transversal realizado no Congo com crianças de seis meses de idade, a amamentação exclusiva foi associada com redução na prevalência de malária falciparum clínica (OR 0,13, IC 95% 0,00 - 0,80) (90). Em estudo em Uganda, o aleitamento materno foi associado com proteção contra infecção por *P. falciparum* em crianças de 6 a 15 meses de idade expostas ao HIV (RR ajustado 0,62, IC 95% 0,44 - 0,88) (91). Em estudo caso controle no Mali, o aleitamento materno por ≥ 2 anos de idade foi associado com redução no risco de malária falciparum grave na infância (OR ajustada 0,57, IC 95% 0,33 - 0,94) (92).

1.2 ESTE ESTUDO

Neste estudo investigamos a malária na infância em uma das regiões de maior endemicidade para a doença da Amazônia Brasileira. Investigamos os fatores associados com a infecção e doença – do nascimento aos dois anos de idade – bem como as implicações da malária para o nível de hemoglobina aos dois anos de idade. O estudo aqui apresentado é complementar ao trabalho que desenvolvi no mestrado, quando investigamos a malária na mesma população, mas durante a vida intrauterina e nascimento (93,94). Assim, os resultados aqui apresentados completam a investigação da malária ao longo dos primeiros 1000 dias de vida da população de estudo – da concepção aos dois anos de idade (95).

2 OBJETIVOS

Nosso objetivo foi investigar aspectos relacionados à epidemiologia da malária nos primeiros dois anos de vida entre crianças da Amazônia Brasileira. Investigamos a incidência de infecção e doença, os fatores de risco associados e a relação entre a exposição à malária e o risco de anemia aos dois anos de idade.

Objetivamos:

1. Investigar a incidência de malária, com base nas notificações de casos registradas no sistema SIVEP-Malária, ao longo dos primeiros dois anos de vida, os fatores associados à malária e o impacto da malária no risco de anemia e no nível de hemoglobina aos dois anos de idade;
2. Avaliar a associação entre os níveis de anticorpos maternos medidos no parto contra três antígenos de fase sanguínea de *P. vivax* – PvDBP, PvAMA1 e PvMSP119 – e o tempo decorrido até o primeiro episódio de malária vivax notificado no sistema SIVEP-Malária;
3. Investigar a prevalência de período de infecções subclínicas e/ou subpatentes por *Plasmodium vivax* nos primeiros dois anos de vida, os fatores com elas associados e o impacto dessas infecções no risco de anemia e no nível de hemoglobina aos dois anos de idade.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO

Este é um estudo de coorte aninhado ao estudo MINA-Brasil – Materno-Infantil no Acre: coorte de nascimentos da Amazônia Ocidental Brasileira (96).

3.1.1 O estudo MINA-Brasil

O estudo MINA-Brasil (auxílio temático FAPESP 2016/00270-6) é coordenado pela Profa. Marly Augusto Cardoso, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP) e conta com a participação de pesquisadores da Universidade Federal do Acre (UFAC) e da *Harvard T. H. Chan School of Public Health*.

O MINA-Brasil é uma coorte de nascimentos que investiga aspectos da saúde e nutrição materno-infantil na cidade de Cruzeiro do Sul, na região do Vale do Alto Juruá no estado do Acre. A coorte MINA-Brasil começou no ano de 2015, sendo estruturada da seguinte forma: (a) acompanhamento de gestantes da região urbana de Cruzeiro do Sul, com ultrassonografia, entrevista estruturada, coleta de sangue venoso e de dados antropométricos; (b) entrevista estruturada e coleta de sangue venoso e de sangue de cordão umbilical das parturientes da maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá residentes na zona urbana, periurbana e rural de Cruzeiro do Sul, sendo esta a linha de base do acompanhamento dos nascidos vivos (96); (c) acompanhamento dos nascidos vivos residentes na região urbana e periurbana de Cruzeiro do Sul até os cinco anos de idade.

A maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá é a maternidade referência na região do Alto Juruá. Em 2016, 96,3% dos bebês nascidos vivos em Cruzeiro do Sul nasceram nessa maternidade - dentre os 1632 nascidos vivos e registrados no município em 2016, 1572 nasceram nessa maternidade e 60 nasceram em ambiente não hospitalar (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinasc/cnv/nvbr.def>). Os dados e amostras do estudo MINA-Brasil foram coletados pela equipe do estudo MINA-Brasil – estudantes e profissionais da UFAC e da USP (96) – em *tablets* programados com o software CPro (<https://www.census.gov/programs-surveys/international-programs.html>), sempre com

rotinas de verificação da qualidade e acurácia. O processamento e a gestão dos dados foram realizados no Stata 15.1 (StataCorp, College Station, TX, USA).

3.1.1.1 Acompanhamento de gestantes residentes na região urbana de Cruzeiro do Sul

Entre fevereiro de 2015 e janeiro de 2016, com a ajuda de profissionais da equipe de Saúde da Família de Cruzeiro do Sul, foram localizadas gestantes residentes na área urbana do município inscritas na assistência pré-natal da Estratégia de Saúde da Família. As gestantes com idade gestacional inferior a 20 semanas no momento do rastreamento – idade calculada de acordo com a data da última menstruação (DUM) - com residência fixa em Cruzeiro do Sul e intenção de parir na maternidade desse município foram convidadas a participar da coorte MINA-Brasil. As gestantes que quiseram participar da coorte receberam visita domiciliar da equipe MINA-Brasil e responderam questionário sociodemográfico e de histórico de saúde. Nesse momento, foi agendada a primeira avaliação clínica, programada para acontecer entre a 16ª e 20ª semana gestacional.

3.1.1.2 Parturientes na maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá

A equipe MINA-Brasil visitou a maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá diariamente, entre julho de 2015 e junho de 2016, e convidou as parturientes residentes em Cruzeiro do Sul, antes da alta hospitalar, a participarem do estudo. Foram convidadas todas as parturientes residentes no município, independentemente da região de moradia. Ao todo, as mães de 1551 nascidos vivos consentiram com a participação no estudo MINA-Brasil – 88,5% dos nascidos vivos na maternidade durante o período de recrutamento.

As participantes do estudo MINA-Brasil junto aos seus filhos responderam, ainda na maternidade, um questionário estruturado sobre a sua condição socioeconômica, condições ambientais, características gestacionais e de histórico obstétrico. Sempre que possível, foram recuperadas amostras do sangue venoso coletado como rotina de internação para o parto, e coletadas amostras de sangue de cordão umbilical.

As participantes do estudo também consentiram que a equipe MINA-Brasil acessasse seus prontuários da maternidade, dos quais foram recuperadas informações referentes à

saúde e assistência no período pré-natal e informações dos desfechos gestacionais – número de visitas de acompanhamento pré-natal, idade gestacional no parto, sexo do filho, tipo de parto (vaginal ou cesariano), peso e comprimento ao nascer, entre outras informações.

3.1.1.3 Acompanhamento dos nascidos vivos residentes na região urbana e periurbana de Cruzeiro do Sul

Foram elegíveis para participar de acompanhamento pela coorte MINA-Brasil após o nascimento os nascidos vivos residentes na região urbana e periurbana de Cruzeiro do Sul (n = 1246).

As responsáveis pelas crianças acompanhadas pela equipe MINA-Brasil foram entrevistadas por telefone no primeiro mês pós-parto. Nesse momento, foram coletadas informações sobre práticas de aleitamento materno e morbidades. Foram feitas também visitas em torno de 12 e 24 meses pós-parto. Nas visitas foram coletadas amostras sanguíneas, feitas medidas antropométricas dos participantes acompanhados, e novamente oferecido às responsáveis um questionário estruturado com perguntas demográficas, socioeconômicas, de práticas de aleitamento, práticas comportamentais e de saúde mental materna (96).

A Figura 3 mostra o acompanhamento e avaliações realizadas pelo estudo MINA-Brasil ao longo dos primeiros dois anos de vida dos participantes da coorte.

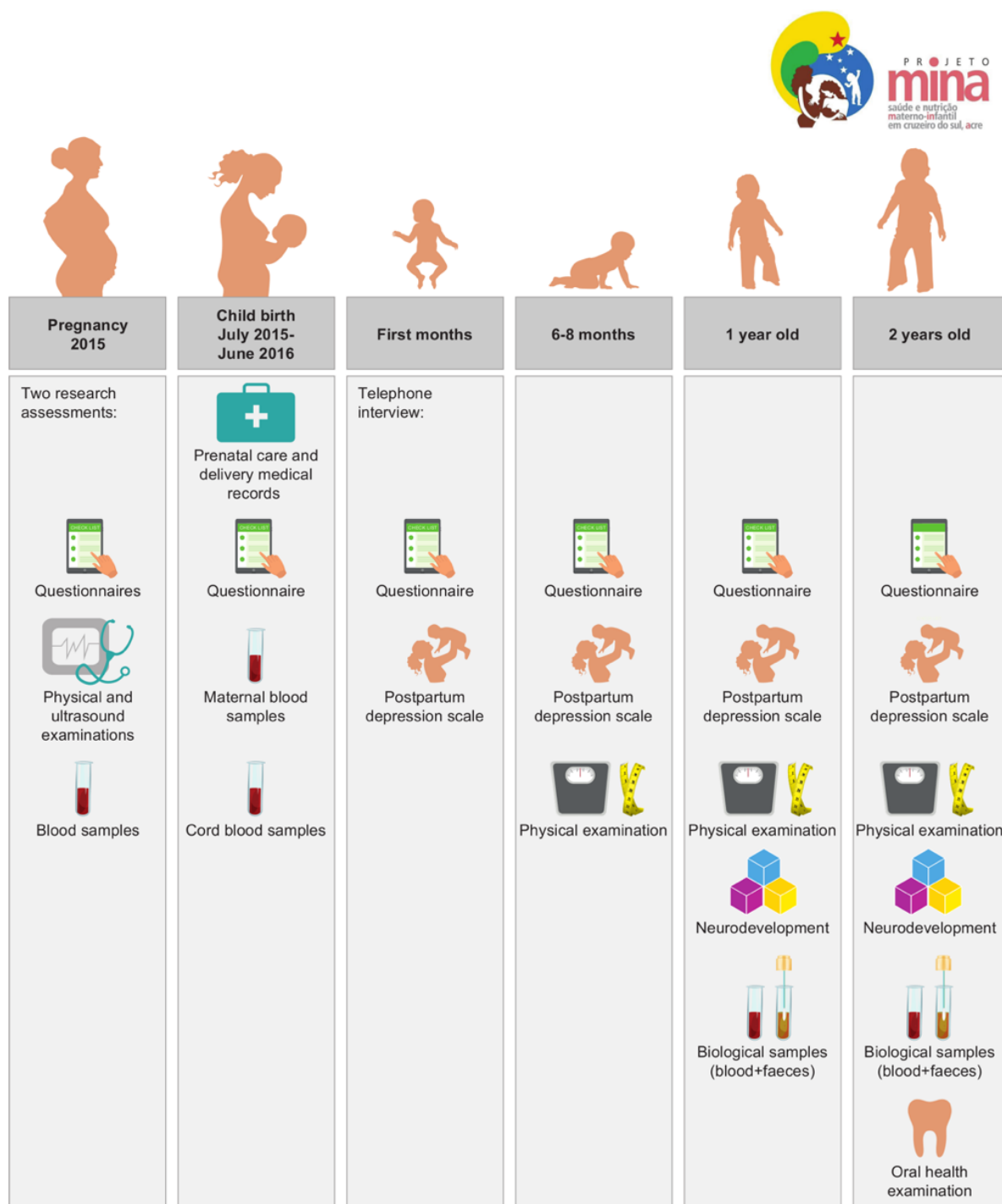


Figura 3 Representação esquemática do acompanhamento e avaliações realizadas pelo estudo MINA-Brasil. No presente estudo usamos os dados coletados durante a gestação, dados e amostras (sangue venoso materno e sangue de cordão umbilical) coletadas no parto, dados e amostras (sangue venoso) coletados na visita de um ano e na visita de dois anos de idade. Figura de Cardoso et al. 2020.

3.1.2 Área de estudo

O município de Cruzeiro do Sul fica na região do Vale do Alto Juruá, no estado do Acre. Localizado a 710 km de Rio Branco, no extremo oeste do país, faz fronteira com o estado do Amazonas e com o Peru (Figura 4). A região fronteiriça é de floresta, onde fica o Parque Nacional da Serra do Divisor. Não há estrada entre Cruzeiro do Sul e Pucallpa, a cidade peruana mais próxima de Cruzeiro do Sul. Cinco municípios acreanos fazem parte da mesorregião do Vale do Juruá – Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Rodrigues Alves, Marechal Thaumaturgo e Porto Walter –, sendo Cruzeiro do Sul o mais populoso, com 89.072 habitantes segundo estimativa de 2020 (<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ac/cruzeiro-do-sul/panorama>).

No ano de 2010, a taxa de escolarização das crianças de 6 a 14 anos em Cruzeiro do Sul era de 94,9% e estava entre as mais baixas do Brasil: posição 5043 entre as 5570 cidades brasileiras avaliadas. Nesse mesmo ano, apenas 12,7% das residências do município possuíam esgotamento sanitário adequado; o Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) – calculado com base em indicadores de longevidade, educação e renda – era classificado como médio (0,664). A taxa de mortalidade infantil – número de mortes no primeiro ano de vida a cada 1000 nascidos vivos – foi estimada em 9,8 em 2016. Aumentando a cada ano, em oposição à taxa de mortalidade infantil média no Brasil, em 2019 a taxa de mortalidade infantil em Cruzeiro do Sul foi estimada em 17,1. Em 2020, a taxa de mortalidade infantil no município caiu para 10,6 e alcançou a média brasileira (<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ac/cruzeiro-do-sul/panorama>) (Figura 5 A).

No que se refere à malária, Cruzeiro do Sul é considerado município de alto risco. Em 2016, no início deste estudo, a Incidência Parasitária Anual (IPA) – calculada a partir do número de casos de malária notificados por 1000 habitantes/ano – foi de 231,9, o quarto maior IPA do país (<http://www.funasa.gov.br/documents/20182/34981/Lista-de-municipios-pertencentes-as-areas-de-risco-ou-endemicas-para-malaria.pdf>). Nos últimos anos os casos de malária diminuíram, mas ainda assim, com IPA de 50,1 em 2021, Cruzeiro do Sul permanece classificado como município de alto risco para doença (Figura 5 B). A malária é um problema na região do Vale do Alto Juruá, na medida em que aproximadamente 8% dos casos de malária notificados no país no ano de 2019 são provenientes dessa região (97). Os

municípios vizinhos de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Rodrigues Alves, respectivamente com IPA de 67,0 e 87,6 em 2021, também são considerados de alto risco para doença.

A maioria dos casos de malária em Cruzeiro do Sul é causada por *P. vivax*. No período deste estudo, entre os anos de 2015 e 2018, *P. vivax* foi responsável, em média, por 78,5% dos casos de malária notificados no município (<https://public.tableau.com/app/profile/mal.ria.brasil>) (Figura 5 B). Aproximadamente 71,8% da população de Cruzeiro do Sul mora na área urbana do município; a transmissão de malária em Cruzeiro do Sul, apesar de ser mais prevalente na área rural, acontece também nas regiões urbanizadas (93,97,98).

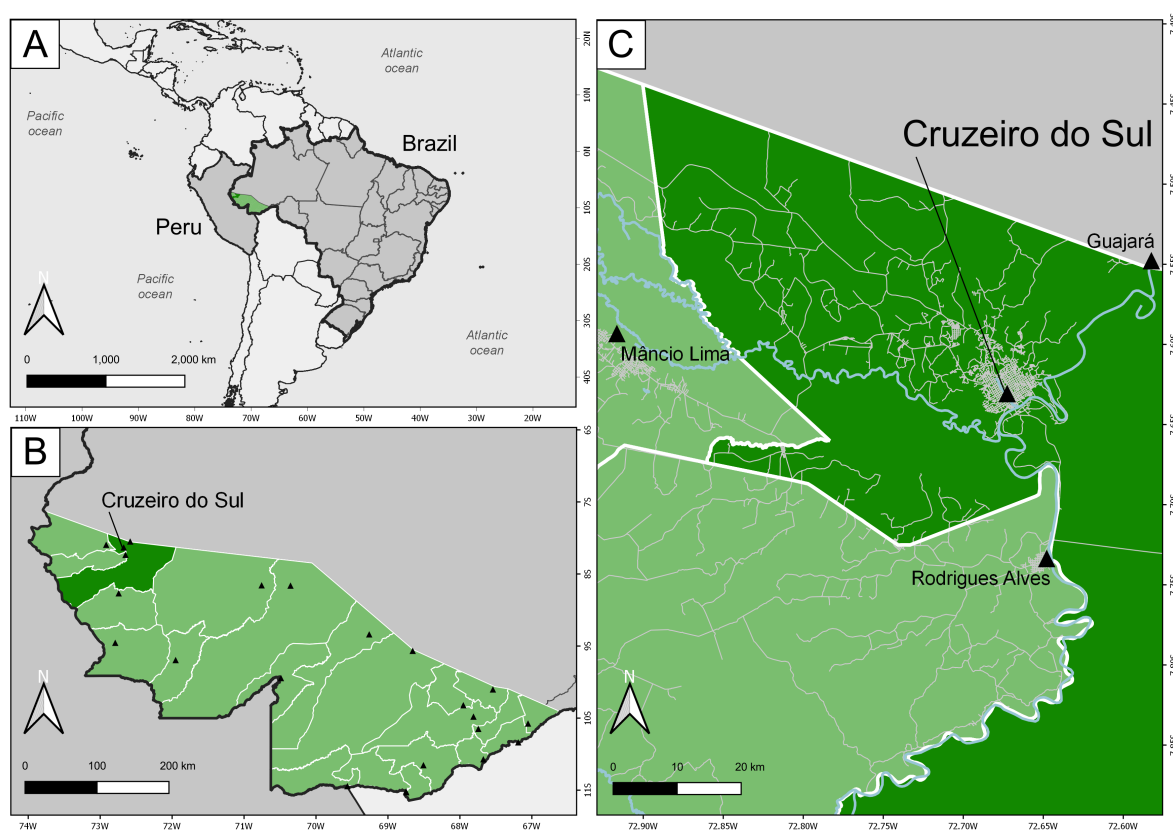


Figura 4 Município de Cruzeiro no mapa

(A) Peru, Brasil e o Estado do Acre em destaque. (B) Estado do Acre destacado em verde e Cruzeiro do Sul em verde mais escuro. (C) Município de Cruzeiro do Sul e municípios vizinhos: Guajará, no Amazonas, Mâncio Lima e Rodrigues Alves no Acre. Os triângulos mostram a localização da área urbana do município. Estradas e ruas estão representadas em cinza claro. Rios representados em azul. Figura elaborada com o programa QGIS software version 3.14 por Igor Cavallini Johansen.



Figura 5 Taxa de mortalidade infantil e notificação de malária no Brasil e em Cruzeiro do Sul (A) Taxa de mortalidade infantil no Brasil (linha tracejada) e em Cruzeiro do Sul (linha contínua) entre os anos de 2007 e 2020. O período que este estudo foi realizado está destacado em verde; em tom mais escuro está destacado o período em que os participantes do estudo MINA-Brasil tinham 1 ano de idade (<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ac/cruzeiro-do-sul.html>). (B) Casos de malária notificados no Brasil (linha tracejada) e em Cruzeiro do Sul (linha contínua; em rosa claro *P. vivax*, em rosa escuro *P. falciparum*) entre os anos de 2007 e 2020. O período que este estudo foi realizado está destacado em verde. (https://public.tableau.com/app/profile/mal.ria.brasil/viz/Dadosparacidade_201925_03_2020/Inicio).

3.1.2.1 Diagnóstico e notificação de malária na Amazônia Brasileira

A malária no Brasil é uma doença de notificação obrigatória, o tratamento é definido pelo Ministério da Saúde e está disponível somente através do Sistema Único de Saúde (SUS). O paciente só recebe antimaláricos após o diagnóstico laboratorial. O padrão-ouro de diagnóstico de malária no país é a microscopia de gota espessa, preparada com sangue de punção digital (99). O limite de sensibilidade em campo da microscopia de gota espessa é de 100 parasitos/ μ L de sangue (99). A notificação de diagnósticos positivos deve ser feita no

sistema de notificação de casos de malária no Brasil, o SIVEP-Malária (Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica – Malária).

Na maioria das vezes, a busca de casos de malária no país é feita de forma passiva. Assim, o diagnóstico da infecção costuma acontecer somente quando o paciente procura assistência e casos assintomáticos costumam não ser diagnosticados. O Ministério da Saúde preconiza que a busca ativa de infecções por *Plasmodium*, independentemente da presença de sintomas, seja feita em todas as consultas de pré-natal. Apesar da recomendação, o diagnóstico de malária nas rotinas de pré-natal não era comum na época do estudo em campo (100).

A primaquina é o único medicamento em uso no Brasil que pode tratar as formas dormentes de *P. vivax*, os hipnozoítos. Gestantes e crianças menores de 6 meses não devem receber primaquina como tratamento para infecção por *P. vivax*. Por não poderem receber esse medicamento, gestantes, puérperas e bebês são particularmente vulneráveis às recaídas de malária vivax (101). Atualmente, o Ministério da Saúde recomenda que gestantes diagnosticadas com infecções por *P. vivax* recebam tratamento com cloroquina por três dias, e profilaxia de recaídas com cloroquina administrada semanalmente ao longo da gestação até o primeiro mês pós-parto. Quando o estudo MINA-Brasil começou, época em que a população deste estudo foi gestada, a recomendação do Ministério da Saúde era diferente: a profilaxia com cloroquina em gestantes deveria ser prescrita por 12 semanas após o segundo diagnóstico de infecção por *P. vivax* na gestação (102).

3.1.3 População do estudo

Neste estudo, trabalhamos com a totalidade da população autorizada a participar do estudo MINA-Brasil na maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá que completou o segundo aniversário de vida. Foram incluídas tanto as crianças residentes na região urbana, como as residentes na região rural de Cruzeiro do Sul. Trabalhamos também com recortes da população de crianças residente na região urbana e periurbana do município que foi acompanhada pelo projeto MINA-Brasil após o nascimento

Acompanhamos os participantes da coorte MINA-Brasil do nascimento até os dois anos de idade. Trabalhamos com dados e amostras coletados na maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá e nas visitas de um ano e de dois anos de idade. Além dos

dados primários coletados pela equipe MINA-Brasil e de informações recuperadas dos prontuários da maternidade, trabalhamos com o banco de dados do sistema SIVEP-Malária. Recuperamos retrospectivamente do sistema SIVEP-Malária os casos de malária notificados nos primeiros dois anos pós-parto, tanto de malária materna (mães dos participantes) como de malária infantil.

3.1.3.1 Histórico de malária na gestação

Antes de investigarmos a malária na infância, pesquisamos aspectos da malária na gestação das mães da população deste estudo, quando as crianças participantes da coorte MINA-Brasil viviam a vida intrauterina. Investigamos os fatores associados com o diagnóstico de malária na gestação e as implicações dessa exposição para os desfechos gestacionais de nível de hemoglobina materna no parto, e escore z de peso e comprimento ao nascer (93,94).

A prevalência de malária na gestação notificada no sistema SIVEP-Malária nas mães de participantes deste estudo foi de 8,0% (n = 94/1180). Entre as gestantes expostas, 21,3% (n = 20/94) tiveram mais de um episódio de malária notificado ao longo da gestação. A prevalência de infecção por *Plasmodium* no parto diagnosticada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi de 7,5% (n = 89/1180) – 89,9% (n = 80/89) dessas infecções foram assintomáticas. A prevalência de malária gestacional, definida como notificação de ao menos um caso de malária ao longo da gestação ou infecção por *Plasmodium* diagnosticada no parto por qPCR, foi de 12,5% (n = 148/1180). *P. vivax* foi responsável por 74,6% das notificações de malária e por 83,1% das infecções por *Plasmodium* diagnosticadas no parto. Infecção congênita por *Plasmodium*, definida como diagnóstico por qPCR positivo para *Plasmodium* em amostra de cordão umbilical, foi rara na população deste estudo: entre as 637 amostras avaliadas, 4 (0,6%) tiveram diagnóstico positivo para *P. vivax* e 2 para *P. falciparum* (0,3%). Morar em área rural foi o principal fator associado à malária gestacional (OR ajustada 3,58 IC 95% 2,42 - 5,29, P = <0,001); gestantes do quintil menos pobre tiveram menor chance de diagnóstico de malária gestacional (OR ajustada 0,39 IC 95% 0,18 - 0,82, P = 0,01) (93).

Observamos que a notificação de um único episódio de malária vivax ao longo da gestação, quando comparado com gestações livres de malária gestacional, foi suficiente para

impactar negativamente os desfechos gestacionais analisados: peso ao nascer, redução de 0,30 no escore z (IC 95% -0,57 - -0,02, $P = 0,04$); comprimento ao nascer, redução de 0,41 no escore z (IC 95% -0,71 - -0,11, $P = 0,01$); nível de hemoglobina materna no parto, redução de 0,39 g/100ml (IC 95% -0,76 - -0,02, $P = 0,03$). Episódios repetidos de malária vivax tiveram efeito negativo mais pronunciado para peso ao nascer, redução de 0,65 no escore z (IC 95% -1,19 - -0,11, $P = 0,02$), e para o nível de hemoglobina materna parto, redução de 0,92 g/100ml (IC 95% -1,64 - -0,21, $P = 0,01$) (93).

3.1.3.2 Práticas de aleitamento materno no primeiro mês de vida

Ao completarem o primeiro mês de vida, 1,6% ($n = 15/962$) dos participantes do estudo MINA-Brasil acompanhados após o nascimento já não eram amamentados, 61,7% ($n = 594/962$) recebiam leite materno e também outros alimentos, e 36,7% ($n = 353/962$) recebiam somente leite materno (98). Entre os bebês avaliados, 88,5% ($n = 803/907$) foram amamentadas na primeira hora após o nascimento.

3.2 CASOS DE MALÁRIA NOTIFICADOS NOS PRIMEIROS 24 MESES PÓS-PARTO

Identificamos casos de malária materna e infantil nos primeiros dois anos pós-parto através do cruzamento do banco de dados do projeto MINA-Brasil com o banco de dados do sistema SIVEP-Malária. Porque a malária no Brasil é uma doença de notificação obrigatória e os medicamentos antimaláricos estão disponíveis somente através do SUS, esperamos que tenha sido localizada a maioria dos casos de malária notificados na população deste estudo.

A busca das crianças da coorte MINA-Brasil no banco de dados do sistema SIVEP-Malária foi feita através de similaridade entre nome materno, sexo e idade. A busca dos casos de malária materna seguiu o mesmo princípio, mas usamos como referência de busca o nome de registro materno (101). O período de dois anos pós-parto foi ajustado para cada participante. Foram consideradas elegíveis para pareamento todas as crianças que tinham o nome materno disponível. Todos os pareamentos foram conferidos manualmente.

3.3 SOROLOGIA

Usamos sorologia para investigar (a) a associação entre anticorpos IgG maternos contra as fases sanguíneas de *P. vivax* adquiridos na vida intrauterina e proteção contra a malária vivax no início da vida e (b) para identificar exposições prévias ao *P. vivax* nos primeiros dois anos de vida.

Neste trabalho, utilizamos três antígenos recombinantes da fase sanguínea de *P. vivax*: resíduos 43-487 de PvAMA1, cepa brasileira, expressos em *Pichia pastoris* (103); resíduos 194-521 de PvDBP, cepa Salvador I expresso em *Escherichia coli* (104); resíduos 1616-1704 de PvMSP119, cepa Belém expressos em *Escherichia coli* (105). Os antígenos PvAMA1 e PvMSP119 foram gentilmente cedidos pela Dra. Irene S. Soares (USP), e o antígeno PvDBP pelo Dr. Christopher L. King (*Case Western Reserve University*). Interpretamos que a presença de anticorpos para algum dos três antígenos avaliados neste estudo é indicação de presença de anticorpos contra *P. vivax*; esperamos que os indivíduos com sorologia positiva tenham repertório de anticorpos contra esse parasito que vai além dos antígenos avaliados neste estudo (106).

Os níveis de anticorpos IgG foram estimados por ELISA. Cada amostra foi avaliada para as três proteínas em paralelo, de forma a diminuir o número de descongelamentos, sempre em duplicata técnica. Cada placa contou com 10 controles negativos compostos por amostras de alunos da USP nunca expostos a regiões endêmicas para malária – gentilmente cedidos pela Dra. Natalia F. Soares (USP). Placas de 96 poços (high-binding 96-well Costar microplates – Corning) foram sensibilizadas com 50µl/poço de antígeno – concentração de 1 µg/ml para PvAMA1 e 0,025 µg/ml para PvDBP e PvMSP119 – em PBS (tampão salino fosfatado) a 4°C durante a noite. No dia seguinte, após lavagem com PBS/0,05% Tween 20, as placas foram bloqueadas com 200µl de solução de PBS/5% leite em pó desnatado por 2h a 37 °C. Em seguida, após lavagem, colocamos 50µl/poço dos plasmas a serem testados diluídos em PBS/5% leite em pó desnatado – diluição de 1:800 para PvAMA1 e PvMSP119, e 1:200 para PvDBP - e incubamos por 1h a 37 °C. Após lavagem, colocamos 50µl/poço de anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado a peroxidase (SouthernBiotech, Birmingham, AL), diluído a 1:8000 em PBS e incubamos por 1h a 37 °C. Após lavagem, revelamos o ensaio com 50µl/poço de TMB; a reação foi parada com 25µl/poço de ácido sulfúrico. As

absorbâncias foram lidas a 450 nm. A concentração de antígeno e de amostra foi otimizada para o máximo sinal considerando o *background* a partir de diluições seriadas com diferentes combinações de concentrações de antígeno e de amostra.

Para investigar a associação entre anticorpos maternos e risco subsequente de malária vivax, utilizamos amostras de sangue venoso materno e cordão umbilical coletadas no parto. Para quantificar a presença de anticorpos, estimamos um valor de corte por placa a partir da média das absorbâncias dos 10 controles negativos presentes na placa mais três desvios padrão. Determinamos um índice de reatividade (IR) a partir da razão da média das absorbâncias da amostra e o valor de corte da placa (média da absorbância da amostra/valor de corte). Consideramos positivas as amostras com $IR > 1$.

Para identificar exposições prévias às fases sanguíneas de *P. vivax* utilizamos amostras coletadas nas visitas de um e dois anos de idade. Dessa vez, optamos por determinar o valor de corte a partir da média das absorbâncias de 42 amostras de pessoas nunca expostas ao *Plasmodium* mais três desvios padrão, gentilmente cedidos pela Dra. Kátia S. Françoso (USP). Para essa parte do estudo, priorizamos a especificidade da metodologia sobre a sensibilidade – o valor de corte definido a partir da placa de negativos foi mais restrito que o valor de corte calculado por placa. O IR foi determinado como a razão da média das absorbâncias da amostra e o valor de corte. Amostras com $IR > 1$ foram consideradas positivas.

3.4 ANÁLISES

Rodamos as análises deste estudo no programa Stata 15.1 (StataCorp, College Station, Texas) e no programa GraphPad Prism versão 9.3 para Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, California USA). Definimos significância estatística como valor de $p < 0,05$ com intervalo de confiança de 95%.

Usamos teste do qui-quadrado para comparar as populações incluídas nas análises com as populações que não foram incluídas por perda de seguimento, por falta de amostra sanguínea, ou por residirem em área rural.

Construímos modelos ajustados para investigar (a) fatores associados com a malária notificada no sistema SIVEP-Malária nos primeiros dois anos de vida, (b) fatores associados com evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* aos dois anos de idade, (c) a

associação entre níveis de anticorpos maternos anti-PvDBP, anti-PvAMA1 e anti-PvMSP119 e o risco de notificação de malária infantil e materna, e (d) a associação entre exposição ao *Plasmodium* no início da vida e o risco de anemia aos dois anos de idade.

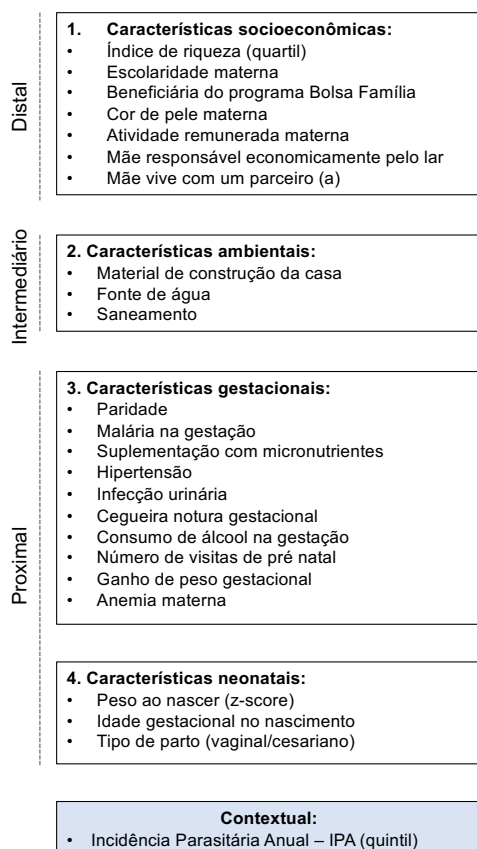
Fizemos a seleção de variáveis independentes a partir de modelos conceituais hierárquicos (107,108) (Figura 6 e 7). Os determinantes dos desfechos de interesse foram organizados em níveis distal, intermediário e proximal. Na abordagem hierarquizada as variáveis do nível distal podem ter influência sobre as variáveis do nível intermediário; o nível proximal, por sua vez, pode ser influenciado pelas variáveis dos níveis intermediário e distal. As variáveis que se ajustaram ao desfecho de interesse com associação estatística de $p < 0,20$ na análise bruta foram testadas no modelo ajustado. Em cada nível do modelo ajustado, mantiveram-se as variáveis com associação de $p < 0,10$ com o desfecho de interesse.

Incluímos nos modelos as seguintes variáveis: índice de riqueza estratificado em quartis (96); escolaridade materna (≤ 9 anos, 10 a 12 anos, > 12 anos); família beneficiária do programa Bolsa Família; cor da pele materna (branca, não branca); atividade remunerada materna; mãe responsável economicamente pelo núcleo familiar; mãe vivendo com o parceiro(a); área de residência (urbana, periurbana/rural); Incidência Parasitária Anual (IPA) na região de moradia; número de habitantes na residência (até 2, 3 a 4, 5 ou mais moradores); material de construção da residência (alvenaria, madeira/misto); fonte de água (rede pública de distribuição, poço/cacimba/nascente, rio/igarapé, compra/mineral); saneamento (rede pública/fossa, céu aberto/rio); idade materna (< 19 , 19 a 34, ≥ 35); paridade (primigesta, 1 gestação prévia, 2 gestações prévias, 3 gestações prévias, 4 ou mais gestações prévias); malária na gestação (notificação de malária no sistema SIVEP-Malária ao longo da gestação ou diagnóstico molecular no parto positivo para *Plasmodium*); suplementação com micronutrientes na gestação (ferro, polinutrientes, vitamina A, ácido fólico); comorbidades maternas autorreferidas (hipertensão, infecção urinária, cegueira noturna gestacional); consumo de álcool na gestação (referente aos últimos três meses: nunca, ao menos uma vez); número de visitas de pré-natal (< 6 , ≥ 6); ganho de peso gestacional (adequado, insuficiente, excessivo); anemia materna (concentração de hemoglobina $< 11\text{g}/100\text{mL}$ no parto); escore z de peso ao nascer com base nos parâmetros do INTERGROWTH-21st (96); idade gestacional no nascimento (109); tipo de parto (vaginal, cesariano); apoio social materno de acordo com o *Medical Outcomes Study* (MOS)(98,110);

frequenta creche; costuma tomar banho de sol; aleitamento materno (variável contínua); amamentação prolongada (<12 meses, ≥ 12 meses); suplementação com micronutrientes; diagnóstico de pneumonia desde o nascimento; diagnóstico de dengue desde o nascimento; ocorrência de hospitalização desde o nascimento; episódio de infecção com helmintos desde o nascimento; diarreia nos últimos 15 dias; sangramento nas fezes nos últimos 15 dias; vômito nos últimos 15 dias; sintomas gripais nos últimos 15 dias.

A Incidência Parasitária Anual na região de moradia foi uma das variáveis de ajuste mais importantes deste estudo. O sistema de controle de endemias de Cruzeiro de Sul divide o município em localidades que partilham características epidemiológicas e ecológicas. Cada localidade foi georreferenciada e teve as moradias e habitantes registrados pela equipe de controle de endemias. A partir das coordenadas de latitude e longitude de cada localidade, tamanho da população, e número de casos de malária diagnosticados entre 2016 e 2018, calculamos o IPA médio na localidade no período de estudo e determinamos o IPA na região de moradia.

A



B

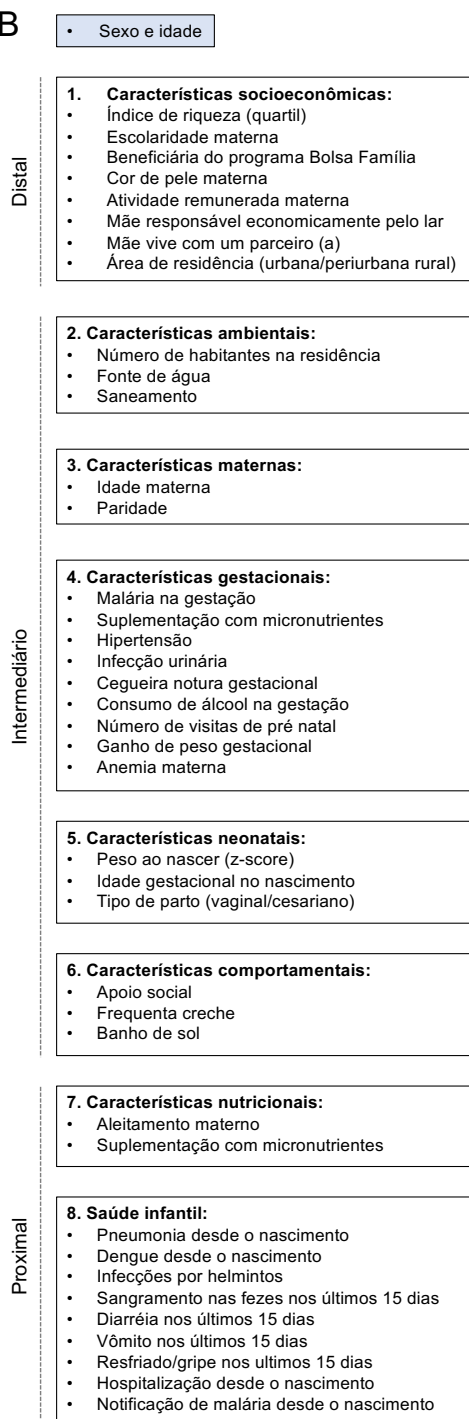


Figura 6 Modelos conceituais hierárquicos para investigação de notificação de malária no sistema SIVEP-Malária nos primeiros dois anos de vida - como desfecho e como exposição

(A) Fatores associados com notificação de malária no sistema SIVEP-Malária (n = 1494) e associação entre níveis de anticorpos maternos anti-PvDBP, anti-PvAMA1 e antiPvMSP119 e o risco de notificação de malária infantil (n = 1095). (B) Associação entre notificação de malária e risco de anemia aos dois anos de idade (n = 860). Variáveis em azul mantiveram-se no modelo ajustado independentemente do nível de associação com o desfecho na análise bruta ou ajustada.

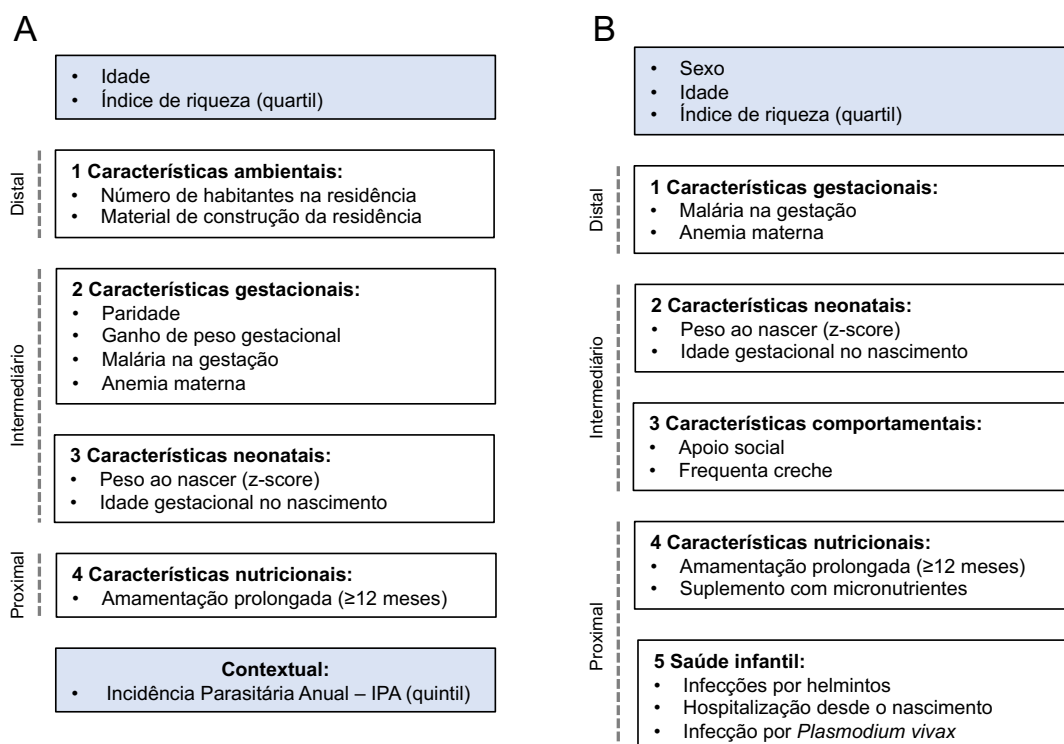


Figura 7 Modelos conceituais hierárquicos para investigação de evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* - como desfecho e como exposição

(A) fatores associados com evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* ($n = 431$). (B) Associação entre evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* e risco de anemia aos dois anos de idade ($n = 428$). Variáveis em azul mantiveram-se no modelo ajustado independentemente do nível de associação com o desfecho na análise bruta ou ajustada.

3.4.1 Fatores associados com notificação de malária nos primeiros dois anos de vida

Para investigar fatores associados com notificação de malária ao longo dos primeiros dois anos de vida, construímos modelos de regressão binomial negativa multinível – comando *menbreg* no Stata. Avaliamos dois desfechos: (a) número de notificações de malária nos primeiros dois anos de vida e (b) número de notificações de malária vivax nos primeiros dois anos de vida. A variável IPA na região de moradia estratificada em quintis foi incluída no modelo como variável contextual. Com o objetivo de investigar a associação entre IPA na região de moradia e risco de notificação de malária, fizemos também regressão binomial negativa com a variável IPA na região de moradia como variável independente não contextual – comando *nbreg* no Stata.

Participaram desta análise todas as crianças do estudo MINA-Brasil com informação de notificação de malária no sistema SIVEP-Malária e IPA na região de moradia – tanto as crianças residentes na região rural, como as residentes na região urbana de Cruzeiro do Sul

(n = 1494). O modelo conceitual hierárquico construído para selecionar as variáveis independentes dessa análise está esquematizado na Figura 6 A.

3.4.2 Sorologia de amostras coletadas no parto e análise de sobrevivência

Avaliamos a associação entre idade materna e presença de anticorpos anti-PvDBP, anti-PvAMA1 e anti-PvMSP119 em amostras de sangue venoso materno coletadas no parto com teste do qui-quadrado para tendência linear de Mantel-Haenszel. Usamos o teste de Mann-Whitney para comparar níveis de anticorpos presentes em amostras de parturientes infectadas e não infectadas por *P. vivax*. Investigamos a correlação entre os níveis de anticorpos em amostras de sangue venoso materno e amostras de sangue de cordão umbilical com o teste de correlação de Spearman – comando *spearman* no Stata.

Para investigar a associação entre níveis de anticorpos maternos no momento do parto e risco de notificação de malária vivax infantil e materna, fizemos análise de regressão de riscos proporcionais de Cox com observações incompletas (participantes com diagnóstico de *P. falciparum* foram censurados) – comando *stcox* no Stata. As análises de sobrevivência de casos de malária materna no primeiro e segundo ano pós-parto foram feitas separadamente porque no modelo com tempo de 24 meses houve violação do pressuposto de riscos proporcionais, de acordo com teste de Schoenfeld – comando *stphtest* no Stata. Para todas as análises de sobrevivência os níveis de anticorpos foram estratificados em quintis (primeiro quintil, menores valores de IR).

Participaram das análises de sobrevivência todas as crianças e mães do estudo MINA-Brasil, residentes na região rural e urbana de Cruzeiro do Sul, com informação de notificação de malária no sistema SIVEP-Malária, IPA na região de moradia e disponibilidade de amostra sanguínea materna coletada no parto (n = 1095). Selecionamos as variáveis independentes de ajuste com o mesmo modelo conceitual hierárquico usado na análise binomial negativa para o desfecho de número de notificações de malária (Figura 6 A).

3.4.3 Fatores associados com evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* aos dois anos

Para investigar fatores associados com evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* aos dois anos construímos modelos de regressão multinível de Poisson com variância robusta para o desfecho binário positivo/negativo (111) – comando *mepoisson* no Stata. Incluímos no modelo a variável IPA na região de moradia estratificada em quintis como variável contextual.

Realizamos essa análise com recorte da população acompanhada pela coorte MINA-Brasil até os dois anos de idade ($n = 431$). Por ser uma análise composta apenas por crianças que foram acompanhadas pela coorte MINA-Brasil, pudemos incluir no modelo a variável aleitamento materno, informação que não tínhamos disponível para toda a população que participou da análise binomial negativa para o desfecho de número de notificações de malária ao longo dos primeiros dois anos de vida. As variáveis idade (momento em que foi feita a coleta de amostra usada para sorologia) e índice de riqueza foram incluídas no modelo como variáveis fixas: variáveis que se mantiveram no modelo final independentemente do nível de associação com o desfecho na análise bruta ou ajustada. O modelo conceitual hierárquico usado para seleção de variáveis independentes está esquematizado na Figura 7 A.

3.4.4 Infecção por *Plasmodium* e anemia aos dois anos de idade

Para avaliar a associação entre exposição ao *Plasmodium* nos primeiros 24 meses de vida e anemia aos dois anos de idade, construímos modelos de regressão de Poisson com variância robusta para o desfecho binário com anemia/sem anemia (111) – comando *poisson* no Stata.

Primeiramente investigamos a associação entre notificação de malária e risco de anemia aos dois anos de idade. Os modelos foram sempre ajustados para idade (momento em que o nível de hemoglobina foi medido) e sexo. Investigamos quatro exposições diferentes: (a) número de notificações de malária nos primeiros dois anos (0, 1, 2+), (b) número de notificações de malária vivax nos primeiros dois anos (0, 1, 2+), (c) notificação de malária nos 12 meses prévios à medição, (d) notificação de malária vivax nos 12 meses

prévios à medição. Nas análises, a referência foram crianças sem nenhuma notificação de malária vivax identificada no sistema SIVEP-Malária. Participaram dessa análise as crianças acompanhadas pela coorte MINA-Brasil após o nascimento e que tinham informação de nível de hemoglobina aos dois anos de idade (n = 860).

Investigamos também a associação entre evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* e risco de anemia aos dois anos de idade. Os modelos foram sempre ajustados para idade (momento em que o nível de hemoglobina foi medido), sexo e índice de riqueza. Investigamos quatro exposições diferentes: (a) evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* identificada na visita de um ou dois anos, (b) evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* identificada na visita de dois anos, (c) evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* ou notificação de malária vivax, (d) somente evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* e nenhuma notificação de malária vivax. Nas análises, a referência foram crianças sem nenhuma infecção prévia por *P. vivax* identificada, seja por sorologia ou notificação no sistema Sivep-Malária. Realizamos essa análise com recorte da população acompanhada pela coorte MINA-Brasil nos primeiros dois anos de vida (n = 428).

Porque o nível de hemoglobina aos dois anos na população deste estudo não tem distribuição normal ($p < 0,001$ no teste de Shapiro-Wilk – comando *swilk* no Stata), fizemos também análise de regressão quantílica (IC 95% por *bootstrap* calculado a partir de 500 pseudorreplacatas) para investigar a associação entre notificação de malária nos primeiros 24 meses de vida e nível de hemoglobina aos dois anos das crianças dos percentis 25, 50, e 75 – comando *sqreg* no Stata.

3.4.5 Gráficos

Construímos os gráficos deste estudo no programa GraphPad Prism versão 9.3.0 para Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, California USA) e no Python:

UpSetPlot <https://upsetplot.readthedocs.io/en/stable/>

Sankey <https://plotly.com/python/sankey-diagram/#more-complex-sankey-diagram-with-colored-links>

3.5 GLOSSÁRIO

- Malária notificada: qualquer infecção por *Plasmodium* detectada por exame de gota espessa notificada no sistema SIVEP-Malária; em geral casos sintomáticos.
- Malária gestacional: qualquer detecção de *Plasmodium* no sangue materno, seja por exame de microscopia de gota espessa ao longo da gestação e notificado no sistema SIVEP-Malária ou por diagnóstico molecular no parto (93);
- Avaliação sorológica: sorologia por ELISA para anticorpos contra as fases sanguíneas de *P. vivax* – anti-PvDBP, anti-PvAMA1 e anti-PvMSP119;
- Evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax*: presença de anticorpos (IR>1) contra ≥ 2 antígenos (PvDBP, PvAMA1 ou PvMSP119) na visita de um ano ou dois anos de idade;
- Anemia: concentração de hemoglobina menor que 11g/100ml;
- Anemia materna: concentração de hemoglobina menor que 11g/100ml no dia do parto;
- Primeiros 1000 dias de vida: período da concepção até o aniversário de dois anos de idade;
- Primeiros dois anos de vida: aqui consideramos a vida extrauterina, do parto até o aniversário de dois anos de idade;
- Amamentação prolongada: amamentação por ≥ 12 meses.

3.6 ASPECTOS ÉTICOS

Os pais ou responsáveis pelas crianças que participaram deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da coorte MINA-Brasil (Apêndice A). O protocolo de pesquisa do estudo MINA-Brasil foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP, e este trabalho teve aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP – CAAE 97570918.5.0000.5467.

4 RESULTADOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Entre julho de 2015 e junho de 2016, foram identificados 1753 nascidos vivos na maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá, em Cruzeiro do Sul. Ao todo, 1538 mães – 1551 nascidos vivos, sendo 13 pares de gêmeos – concordaram em participar do estudo, autorizaram seus filhos a participarem também, foram entrevistadas, e tiveram seus dados recuperados dos prontuários da maternidade. A equipe MINA-Brasil não conseguiu contato com 18 parturientes; 184 foram convidadas a participar da coorte MINA-Brasil, mas decidiram não participar do estudo (96).

Recuperamos o histórico de notificação de casos de malária nos primeiros dois anos de vida do sistema SIVEP-Malária das crianças que tinham as informações de identificação necessárias para o cruzamento entre o banco de dados do estudo MINA-Brasil e o banco de dados do sistema SIVEP-Malária e que completaram o segundo aniversário de vida. Ao todo, 1539 crianças – 99,2% dos que concordaram em participar do estudo e 87,8% dos nascidos vivos entre julho de 2015 e junho de 2016 na maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá – tiveram o histórico de casos de notificação de malária recuperados.

Neste estudo, realizamos as análises que envolveram o desfecho de anemia aos dois anos de idade com as crianças acompanhadas pela coorte MINA-Brasil (96) que participaram da visita feita aos dois anos, e que tinham a informação de nível de hemoglobina aos dois anos disponível ($n = 860$). As crianças acompanhadas pela coorte MINA-Brasil que participaram da visita de um ano e de dois anos de idade, e que tinham disponíveis amostras de plasma sanguíneo coletadas nas duas visitas, participaram da avaliação sorológica e tiveram exposições prévias por *P. vivax* identificadas por sorologia ($n = 435$). As crianças residentes na área rural ($n = 305$), as mais expostas à malária (112), não foram acompanhadas após o nascimento pela coorte MINA-Brasil e, portanto, não participaram das análises que envolveram coletas de dados primários e amostras após o nascimento. O fluxograma deste trabalho, com as informações de quantidade de participantes e de perda de seguimento, é apresentado na Figura 8.

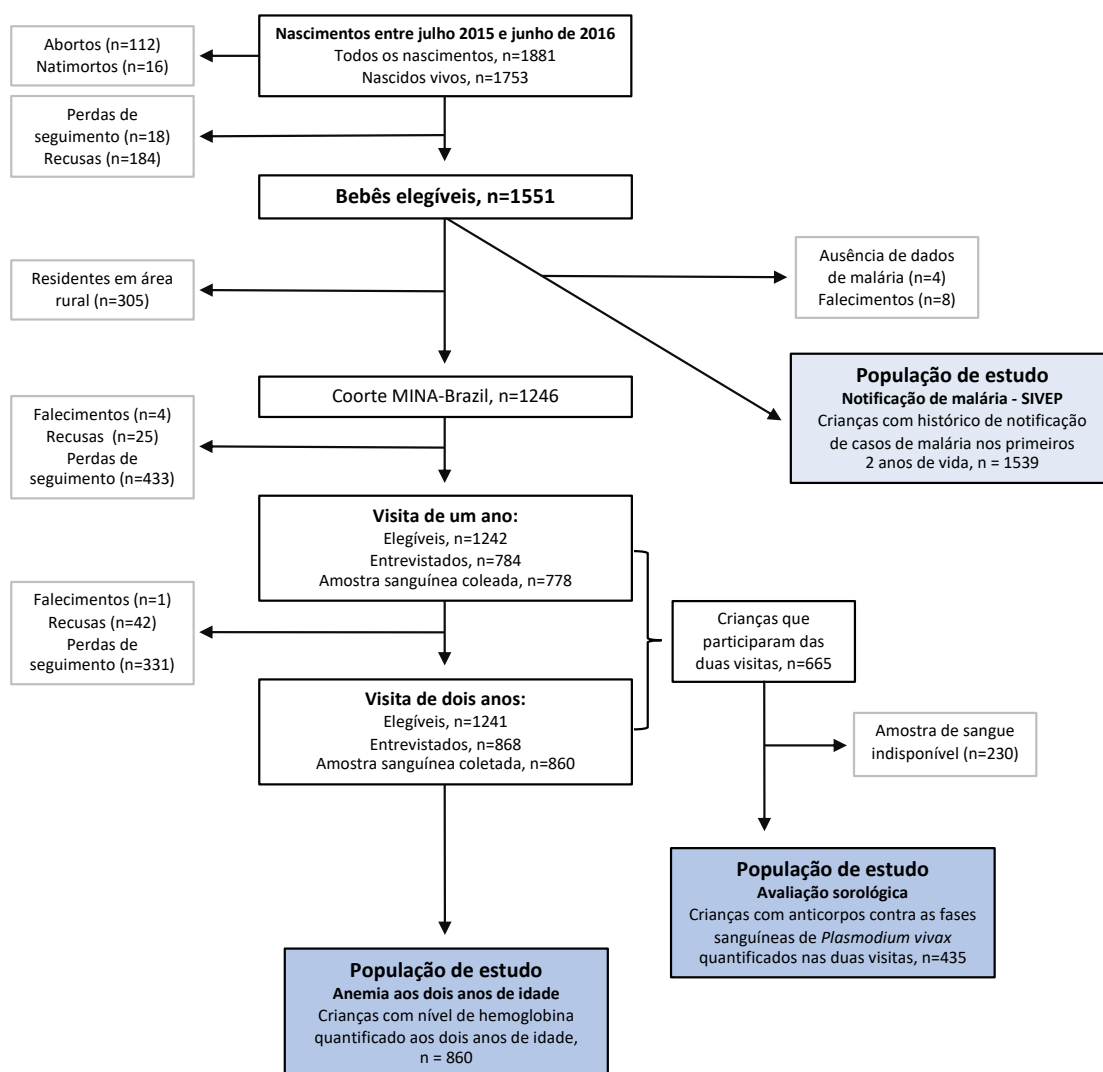


Figura 8 Fluxograma do estudo

Entre julho de 2015 e junho de 2016, foram identificados 1753 nascidos vivos na maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá, em Cruzeiro do Sul. Participantes e perdas de seguimento, do nascimento aos dois anos de idade, são mostrados na figura. Estão destacadas em azul as populações que tiveram histórico de casos de notificação de malária recuperados do sistema SIVEP-Malária; em tom mais forte, a população que teve o nível de hemoglobina quantificado aos dois anos de idade, e a população que teve exposições prévias ao *Plasmodium vivax* nos dois primeiros anos de vida identificadas por sorologia.

4.1.1 Perdas: comparação entre as crianças que participaram e que não participaram das análises de anemia aos dois anos de idade e da avaliação sorológica por residirem na região rural, por perda de seguimento, por recusas ou por indisponibilidade de amostra sanguínea

Comparamos a população que participou da análise de anemia aos dois anos de idade ($n = 860$) com os nascidos vivos autorizados a participarem da coorte MINA-Brasil, mas que não foram incluídos nas análises por residirem na região rural de Cruzeiro do Sul, por perda de seguimento, recusas ou indisponibilidade de amostra sanguínea ($n = 691$ perdas). Fizemos uma segunda análise comparativa somente entre as crianças residentes na região urbana e periurbana de Cruzeiro do Sul que participaram ($n = 860$) e que não participaram desta parte da pesquisa ($n = 386$ perdas), mas que seriam elegíveis para acompanhamento pela coorte MINA-Brasil após o nascimento (Tabela 1).

Fizemos as mesmas comparações com a população que participou da avaliação sorológica para identificação de exposições prévias ao *P. vivax* ($n = 435$). Primeiramente comparamos os participantes com a população que não participou dessa parte da pesquisa, incluindo as 305 crianças residentes na região rural ($n = 1116$ perdas). Em seguida, fizemos a comparação somente com as crianças residentes na região urbana e periurbana de Cruzeiro do Sul ($n = 811$ perdas) (Tabela 2).

As crianças que seriam elegíveis para o acompanhamento pela coorte MINA-Brasil após o nascimento, por residirem na região urbana ou periurbana de Cruzeiro do Sul (96), mas que não foram incluídas nas análises de anemia aos dois anos de idade ($n = 386$ perdas) e na avaliação sorológica ($n = 811$ perdas), são filhos de mães mais jovens, de famílias mais pobres, filhos de mães com menor educação formal, filhos de mães com maior proporção de ganho de peso gestacional inadequado e com menor número de consultas de pré-natal ($p < 0,050$ no teste de χ^2) (Tabela 1 e 2). As diferenças são ainda maiores quando incluimos no grupo de perda de seguimento as crianças residentes na área rural de Cruzeiro do Sul ($n = 305$), que são mais pobres, tem mais irmãos, e tiveram maior exposição à malária na vida intrauterina e nos primeiros 24 meses de vida (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 Comparação entre a população que participou (n = 860) e que não participou da análise de anemia aos dois anos de idade mas foi autorizada a participar do estudo MINA-Brasil (n = 691, incluindo 305 crianças residentes na região rural, n = 386 somente residentes na área urbana ou periurbana de Cruzeiro do Sul)

	Todos os nascidos vivos autorizados a participar do estudo MINA-Brasil					Nascidos vivos autorizados a participar do estudo MINA-Brasil residentes na região urbana e periurbana				
	Não participantes (n = 691)		Participantes (n =860)			Não participantes (n = 386)		Participantes (n =860)		
Variáveis	%	n	%	n	P (χ²)	%	n	%	n	P (χ²)
Idade materna										
<19	25.47	176	15.00	129	<0.001	26.42	102	15.00	129	<0.001
19-34	66.43	459	74.07	637		66.84	258	74.07	637	
≥ 35	8.10	56	10.93	94		6.74	26	10.93	94	
Índice de riqueza										
1 (mais pobre)	39.50	252	14.03	118	<0.001	24.86	91	14.03	118	<0.001
2	27.90	178	22.83	192		31.42	115	22.83	192	
3	18.97	121	29.49	248		24.32	89	29.49	248	
4 (menos pobre)	13.64	87	33.65	283		19.40	71	33.65	283	
Escolaridade materna										
≤ 9 anos	59.81	381	28.89	243	<0.001	51.23	187	28.89	243	<0.001
10-12 anos	32.18	205	51.49	433		36.99	135	51.49	433	
> 12 anos	8.01	51	19.62	165		11.78	43	19.62	165	
Cor de pele materna										
Branca	9.72	62	13.08	110	0.046	10.66	39	13.08	110	0.239
Não branca	90.28	576	86.92	731		89.34	327	86.92	731	
Ocupação remunerada materna										
Não remunerada	82.76	528	65.16	548	<0.001	80.60	295	65.16	548	<0.001
Remunerada	17.24	110	34.84	293		19.40	71	34.84	293	
Família beneficiária do bolsa família										
Não	49.53	316	62.43	525	<0.001	55.46	203	62.43	525	0.023
Sim	50.47	322	37.57	316		44.54	163	37.57	316	
IPA (quintil)										
1 (menor)	13.48	88	28.02	239	<0.001	22.45	86	28.02	239	0.020
2	16.08	105	21.45	183		27.15	104	21.45	183	
3	18.53	121	20.40	174		22.72	87	20.40	174	
4	24.96	163	18.99	162		20.37	78	18.99	162	
5 (maior)	26.95	176	11.14	95		7.31	28	11.14	95	
Número de habitantes no domicílio										
1 a 2 pessoas	18.18	116	21.17	178	<0.001	19.95	73	21.17	178	0.002
3 a 4 pessoas	36.36	232	46.02	387		36.89	135	46.02	387	
5 pessoas ou mais	45.45	290	32.82	276		43.17	158	32.82	276	
Saneamento										
Rede/fossa séptica	66.98	426	75.09	630	0.001	69.78	254	75.09	630	0.055
Céu aberto/rio	33.02	210	24.91	209		30.22	110	24.91	209	
Material de construção da moradia										
Alvenaria	19.12	122	30.80	259	<0.001	27.32	100	30.80	259	0.225
Madeira	80.88	516	69.20	582		72.68	266	69.20	582	

Tabela 1 Continuação da página anterior

Variáveis	%	n	%	n	P (χ²)	%	n	%	n	P (χ²)
Área de moradia										
Urbana	45.73	316	77.67	668	<0.001	81.87	316	77.67	668	0.093
Periurbana	10.13	70	22.33	192		18.13	70	22.33	192	
rural	44.14	305	0.00	0		.	.	.	.	
Hipertensão crônica na gestação										
Não	89.03	568	87.16	733	0.274	89.07	326	87.16	733	0.352
Sim	10.97	70	12.84	108		10.93	40	12.84	108	
Infecção urinária na gestação										
Não	37.63	260	33.95	292	0.133	30.83	119	33.95	292	0.278
Sim	62.37	431	66.05	568		69.17	267	66.05	568	
Malária na gestação										
Não	83.65	578	91.86	790	<0.001	89.64	346	91.86	790	0.201
Sim	16.35	113	8.14	70		10.36	40	8.14	70	
Número de consultas de pré-natal										
< 6	37.95	255	19.65	168	<0.001	33.25	126	19.65	168	<0.001
≥ 6	62.05	417	80.35	687		66.75	253	80.35	687	
Paridade										
Primigesta	37.93	242	40.67	342	<0.001	43.17	158	40.67	342	0.176
1 gestação prévia	23.20	148	27.35	230		24.32	89	27.35	230	
2 gestações prévias	13.95	89	14.27	120		13.66	50	14.27	120	
3 gestações prévias	7.84	50	8.68	73		6.28	23	8.68	73	
4 ou mais gestações prévias	17.08	109	9.04	76		12.57	46	9.04	76	
Ganho de peso gestacional										
Insuficiente	38.96	194	30.02	242	0.001	34.47	101	30.02	242	0.085
Adequado	34.54	172	35.36	285		37.88	111	35.36	285	
Excessivo	26.51	132	34.62	279		27.65	81	34.62	279	
Idade gestacional										
≥ 37 a <42	89.73	620	89.65	771	0.997	87.56	338	89.65	771	0.553
< 37 semanas	8.97	62	9.07	78		10.88	42	9.07	78	
≥ 42 semanas	1.30	9	1.28	11		1.55	6	1.28	11	
Anemia materna parto										
Não	59.24	388	60.69	494	0.572	59.39	215	60.69	494	0.675
Sim	40.76	267	39.30	320		40.61	147	39.31	320	
Sexo biológico										
Feminino	51.52	356	49.88	429	0.522	51.55	199	49.88	429	0.585
Masculino	48.48	335	50.12	431		48.45	187	50.12	431	
Peso ao nascer										
≥ 2,5 kg a <4,0 kg	87.41	604	85.91	738	0.600	87.31	337	85.91	738	0.656
<2,5 kg	7.24	50	7.57	65		7.51	29	7.57	65	
≥ 4,0 kg	5.35	37	6.52	56		5.18	20	6.52	56	
Notificação de malária nos primeiros dois anos de vida										
Nenhum caso notificado (SIVEP-Malária)	88.66	602	96.16	827	<0.001	92.89	353	96.16	827	0.013
Ao menos um caso notificado (SIVEP-Malária)	11.34	77	3.84	33		7.11	27	3.84	33	

Tabela 2 Comparação entre a população que participou (n = 435) e que não participou da avaliação sorológica para identificação de exposições prévias ao *P. vivax* mas foi autorizada a participar do estudo MINA-Brasil (n = 1116, incluindo 305 crianças residentes na região rural, n = 811 somente residentes na área urbana ou periurbana de Cruzeiro do Sul)

	Todos os nascidos vivos autorizados a participar do estudo MINA-Brasil					Nascidos vivos autorizados a participar do estudo MINA-Brasil residentes na região urbana e periurbana				
	Não participantes (n = 1116)		Participantes (n =435)			Não participantes (n = 811)		Participantes (n = 435)		
Variáveis	%	n	%	n	P (χ²)	%	n	%	n	P (χ²)
Idade materna										
<19	21.51	240	14.94	65	0.008	20.47	166	14.94	65	0.025
19-34	69.53	776	73.56	320		70.9	575	73.56	320	
≥35	8.96	100	11.49	50		8.63	70	11.49	50	
Índice de riqueza										
1 (mais pobre)	30.15	316	12.53	54	<0.001	19.97	155	12.53	54	<0.001
2	26.05	273	22.51	97		27.06	210	22.51	97	
3	21.95	230	32.25	139		25.52	198	32.25	139	
4 (menos pobre)	21.85	229	32.71	141		27.45	213	32.71	141	
Escolaridade materna										
≤ 9 anos	47.85	501	28.54	123	<0.001	39.61	307	28.54	123	0.001
10-12 anos	39.45	413	52.2	225		44.26	343	52.2	225	
>12 anos	12.7	133	19.26	83		16.13	125	19.26	83	
Cor de pele materna										
Branca	11.45	120	12.06	52	0.738	12.5	97	12.06	52	0.826
Não branca	88.55	928	87.94	379		87.5	679	87.94	379	
Ocupação remunerada materna										
Não remunerada	75.38	790	66.36	286	<0.001	71.78	557	66.36	286	0.049
Remunerada	24.62	258	33.64	145		28.22	219	33.64	145	
Família beneficiária do bolsa família										
Não	54.58	572	62.41	269	0.006	59.15	459	62.41	269	0.267
Sim	45.42	476	37.59	162		40.85	317	37.59	162	
IPA (quartil)										
1 (menor)	19.81	213	26.45	114	<0.001	26.21	211	26.45	114	0.373
2	18.33	197	21.11	91		24.35	196	21.11	91	
3	18.98	204	21.11	91		21.12	170	21.11	91	
4	22.51	242	19.26	83		19.5	157	19.26	83	
5 (maior)	20.37	219	12.06	52		8.82	71	12.06	52	
Número de habitantes no domicílio										
1 a 2 pessoas	20.04	210	19.49	84	0.006	21.52	167	19.49	84	0.057
3 a 4 pessoas	39.41	413	47.8	206		40.72	316	47.8	206	
5 pessoas ou mais	40.55	425	32.71	141		37.76	293	32.71	141	
Saneamento										
Rede/fossa séptica	70.53	737	74.19	319	0.157	73.09	565	74.19	319	0.68
Céu aberto/rio	29.47	308	25.81	111		26.91	208	25.81	111	
Material de construção da moradia										
Alvenaria	24.71	259	28.31	122	0.151	30.54	237	28.31	122	0.416
Madeira	75.29	789	71.69	309		69.46	539	71.69	309	

Tabela 2 Continuação da página anterior

Variáveis	%	n	%	n	P (χ²)	%	n	%	n	P (χ²)
Área de moradia										
Urbana	58.06	648	77.24	336	<0.001	79.9	648	77.24	336	0.272
Periurbana	14.61	163	22.76	99		20.1	163	22.76	99	
rural	27.33	305	0	0		.	.	.	.	
Hipertensão crônica na gestação										
Não	88.26	925	87.24	376	0.582	88.02	683	87.24	376	0.694
Sim	11.74	123	12.76	55		11.98	93	12.76	55	
Infecção urinária na gestação										
Não	35.66	398	35.4	154	0.923	31.69	257	35.4	154	0.184
Sim	64.34	718	64.6	281		68.31	554	64.6	281	
Malária na gestação										
Não	86.56	966	92.41	402	0.001	90.51	734	92.41	402	0.258
Sim	13.44	150	7.59	33		9.49	77	7.59	33	
Número de consultas de pré-natal										
< 6	31.81	348	17.32	75	<0.001	27.34	219	17.32	75	<0.001
≥ 6	68.19	746	82.68	358		72.66	582	82.68	358	
Paridade										
Primigesta	38.74	406	41.3	178	0.030	41.49	322	41.3	178	0.161
1 gestação prévia	25.38	266	25.99	112		26.68	207	25.99	112	
2 gestações prévias	14.41	151	13.46	58		14.43	112	13.46	58	
3 gestações prévias	7.44	78	10.44	45		6.57	51	10.44	45	
4 ou mais gestações prévias	14.03	147	8.82	38		10.82	84	8.82	38	
Ganho de peso gestacional										
Insuficiente	36.6	325	26.68	111	<0.001	33.97	232	26.68	111	0.004
Adequado	35.14	312	34.86	145		36.75	251	34.86	145	
Excessivo	28.27	251	38.46	160		29.28	200	38.46	160	
Idade gestacional										
≥ 37 a <42	89.16	995	91.03	396	0.335	87.92	713	91.03	396	0.149
< 37 semanas	9.32	104	8.28	36		10.36	84	8.28	36	
≥ 42 semanas	1.52	17	0.69	3		1.73	14	0.69	3	
Anemia materna parto										
Não	59.07	622	62.5	260	0.226	59.08	449	62.5	260	0.252
Sim	40.93	431	37.5	156		40.92	311	37.5	156	
Sexo biológico										
Feminino	50.54	564	50.8	221	0.925	50.18	407	50.8	221	0.835
Masculino	49.46	552	49.2	214		49.82	404	49.2	214	
Peso ao nascer										
≥ 2,5 kg a <4,0 kg	86.38	964	87.1	378	0.285	85.94	697	87.1	378	0.234
<2,5 kg	7.97	89	5.99	26		8.38	68	5.99	26	
≥ 4,0 kg	5.65	63	6.91	30		5.67	46	6.91	30	
Notificação de malária nos primeiros dois anos de vida										
Nenhum caso notificado (SIVEP-Malária)	91.58	1011	96.09	418	0.002	94.66	762	96.09	418	0.262
Ao menos um caso notificado (SIVEP-Malária)	8.42	93	3.91	17		5.34	43	3.91	17	

4.2 INFECÇÕES POR *PLASMODIUM* AO LONGO DOS PRIMEIROS DOIS ANOS DE VIDA

4.2.1 Casos de malária notificados no sistema SIVEP-Malária

Na primeira parte deste trabalho investigamos a distribuição de casos de malária notificados no sistema SIVEP-Malária ao longo dos primeiros 24 meses de vida. Como base de comparação de nível de incidência ao longo do tempo, descrevemos também a incidência de casos de malária materna notificados no mesmo período (24 meses pós-parto) (Figura 9).

Identificamos no banco de dados do SIVEP 236 casos de malária vivax infantil e 29 casos de malária falciparum ou infecção mista nos primeiros dois anos de vida. A prevalência de período de malária (pelo menos um caso notificado) entre as crianças do estudo foi de 7,1% ($n = 110/1539$) nos primeiros dois anos de vida. Durante o mesmo período, a prevalência de período de malária notificada nas mães foi de 16,8% ($n = 257/1533$). Diagnósticos de malária vivax foram incomuns no primeiro ano de vida; a partir do segundo ano de vida, a incidência da doença nas mães e crianças foi comparável (Figura 9 A). A incidência de malária falciparum foi baixa ao longo de todo o período avaliado (Figura 9 B).

Ainda que a maioria das crianças não tenha tido malária notificada nos primeiros dois anos de vida, entre as que tiveram, episódios repetidos foram comuns: 53,6% ($n = 59/110$) tiveram mais de um caso notificado, chegando ao máximo de 9 casos de malária notificados nos primeiros 24 meses de vida. 19,1% ($n = 21/110$) tiveram ≥ 4 episódios diagnosticados e juntas foram responsáveis por 43,4% de todos os episódios de malária diagnosticados na população de estudo. Entre as crianças que tiveram malária vivax diagnosticada nos primeiros 24 meses de vida, 54,9% ($n = 56/102$) tiveram mais de um caso diagnosticado; nas mães essa proporção foi de 46,1% ($n = 100/217$).

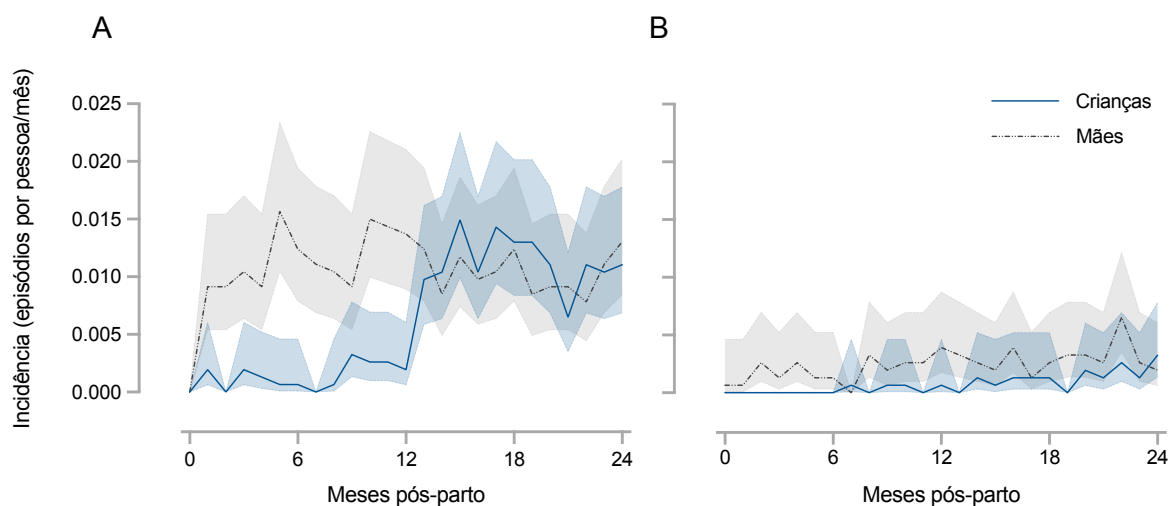


Figura 9 Incidência de casos de malária infantil e materna notificados nos primeiros 24 meses pós-parto (A) Incidência de malária vivax, e (B) malária falciparum ou malária mista falciparum e vivax. Malária infantil em azul (população avaliada: n = 1539), materna em cinza (população avaliada: n = 1533); intervalo de confiança 95% destacado em tom mais claro.

4.2.2 Identificação de exposições prévias às fases sanguíneas de *P. vivax* por sorologia

Na primeira parte deste trabalho investigamos a incidência de casos de malária notificados no sistema SIVEP-Malária ao longo dos primeiros dois anos de vida. Foi possível observar com clareza aumento pronunciado da incidência de notificação de malária vivax a partir do segundo ano de idade (Figura 9) (112). Mas apenas com as informações recuperadas do sistema SIVEP-Malária não é possível saber se no primeiro ano de vida a incidência de infecções por *Plasmodium* na população deste estudo foi baixa, ou se as crianças foram infectadas mas permaneceram com infecções subpatentes, infecções assintomáticas, ou com sintomas leves que desapareceram sem o uso de antimaláricos.

As infecções assintomáticas por *P. vivax* são frequentes na população adulta de áreas endêmicas da Amazônia (93,107,113,114), mas a malária subclínica no início da vida permanece desconhecida na região. Casos assintomáticos, apesar de silenciosos, podem impactar negativamente a saúde (115,116) e contribuir para a manutenção da transmissão de malária (107,117,118). Havia, portanto, uma lacuna importante a ser preenchida: a proporção de infecções por *P. vivax* não notificadas no sistema SIVEP-Malária.

Usamos sorologia para identificar infecções por *P. vivax* que permanecem silenciosas ao sistema de saúde brasileiro. Trata-se de metodologia interessante porque permite identificar exposições ao parasito sem que necessariamente seja feita a coleta de amostra

durante a infecção. No contexto do estudo MINA-Brasil, uma coorte de nascimentos, diminuir o número de coletas de amostras é particularmente importante.

Buscamos anticorpos IgG contra três antígenos presentes nas formas sanguíneas de *P. vivax*: PvAMA1, PvDBP e PvMSP119 (112). Assim, identificamos crianças previamente expostas às formas sanguíneas do parasito, independentemente de terem tido malária vivax notificada no sistema SIVEP-Malária. As amostras utilizadas para a sorologia foram coletadas nas visitas de um e dois anos de idade – idade média na visita 12,72 meses (idade mínima 11,15, máxima 16,23, desvio padrão [DP] 0,75) e 23,67 meses (idade mínima 16,00, máxima 32,13, DP 1,42). O critério de inclusão na avaliação sorológica foi a disponibilidade de amostras de plasma coletadas nas visitas de um e dois anos. Ao todo, 435 crianças residentes na região urbana e periurbana de Cruzeiro do Sul participaram da avaliação sorológica para identificação de exposições prévias ao *P. vivax*.

O primeiro passo da avaliação sorológica foi investigar a presença de anticorpos IgG anti-PvAMA1, anti-PvDBP e anti-PvMSP119 na população de estudo. Na visita de um ano a prevalência de anticorpos contra ao menos um dos três antígenos avaliados foi de 15,6% ($n = 68$, IC 95% 12,5 - 19,4) e para ≥ 2 antígenos 4,4% ($n = 19$, IC 95% 2,8 - 6,8) (Figura 10 A). Aos dois anos a prevalência de anticorpos contra ao menos um antígeno foi de 13,6% ($n = 59$, IC 95% 10,7 - 17,1), para ≥ 2 antígenos 2,5% ($n = 11$, IC 95% 1,4 - 4,5) (Figura 10 B). Anticorpos anti-PvAMA1 foram menos prevalentes do que anticorpos anti-PvDBP e anti-PvMSP119, o que sugere que a resposta humoral contra esse antígeno exija exposições repetidas ao parasito (119). A baixa prevalência para anticorpos anti-PvAMA1 vai ao encontro dos resultados observados na sorologia com amostras maternas, quando vimos que a prevalência de anticorpos anti-PvAMA1 nas parturientes deste estudo está associada positivamente com a idade (112).

Investigamos a soroconversão e sororreversão entre as visitas de um e dois anos de idade. Para essa avaliação criamos três categorias: (a) crianças negativas para os três antígenos, (b) positivas para um dos antígenos, e (c) positivas para ≥ 2 dos antígenos investigados. Entre as 19 crianças positivas para ≥ 2 antígenos na visita de um ano, 94,7% ($n = 18$) mantiveram-se positivas para ao menos um antígeno na visita de dois anos. Entre as 49 crianças positivas para um único antígeno na visita de um ano, 67,3% ($n = 33$)

sororreverteram na visita de dois anos e não tiveram anticorpos detectados para nenhum dos três antígenos investigados (Figura 11).

A partir destes resultados definimos como evidência sorológica de exposição às fases sanguíneas de *P. vivax*, isto é, evidência sorológica de ao menos um episódio de infecção prévia por *P. vivax*, a presença de anticorpos contra ≥ 2 antígenos em ao menos uma das visitas (um ano ou dois anos). Assim, priorizamos a especificidade da metodologia diagnóstica. Porque objetivamos investigar fatores associados com a exposição ao *P. vivax*, e a maior parte das crianças da coorte MINA-Brasil não foi exposta ao parasito, julgamos que a especificidade seria mais importante do que a sensibilidade.

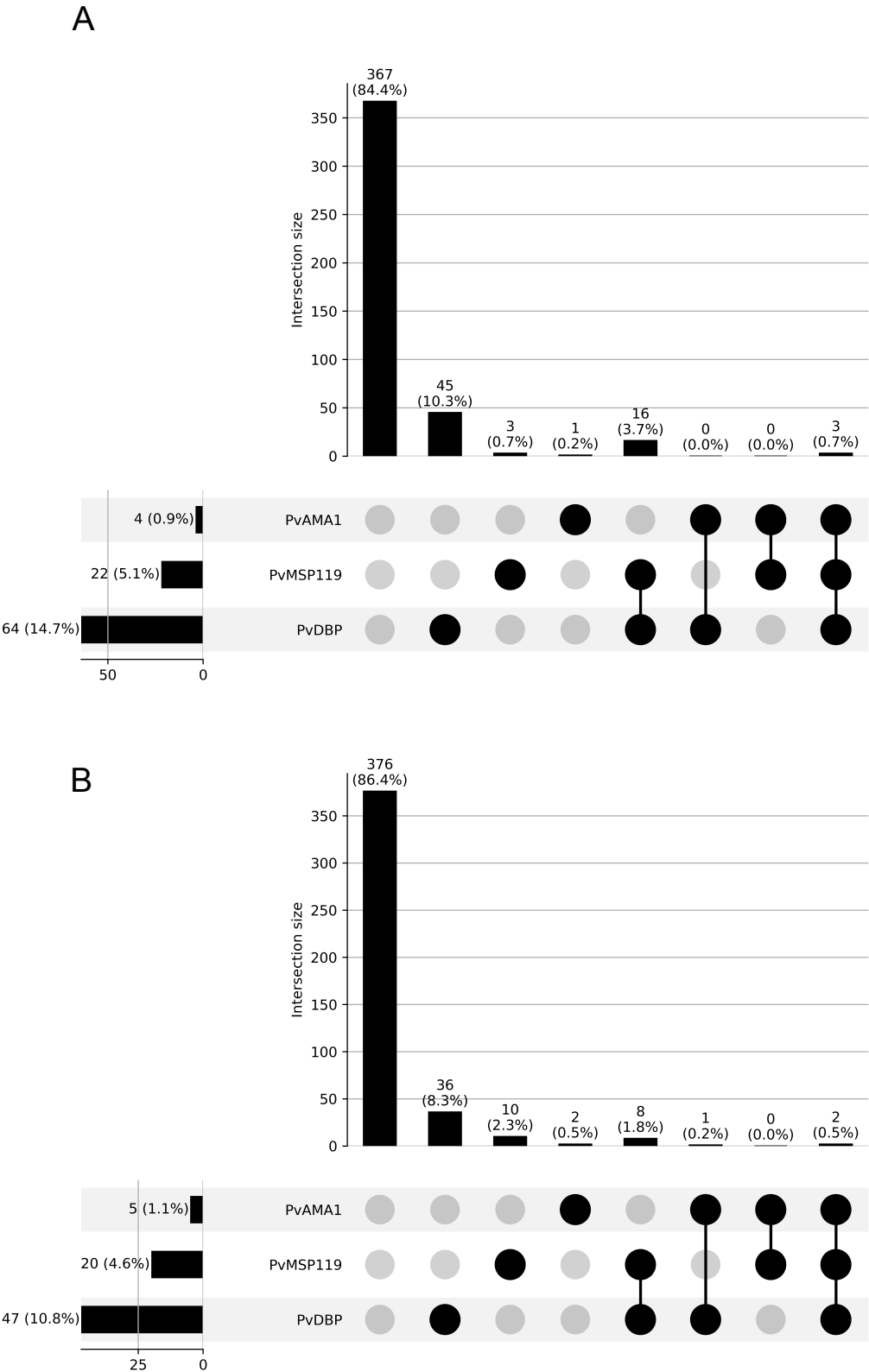


Figura 10 Proporção de crianças com anticorpos IgG anti-PvAMA1, anti-PvDBP e anti-PvMSP119 detectados nas visitas de um ano e dois anos de idade
(A) Visita de um ano e (B) visita de dois anos (n = 435). Círculos em preto indicam positividade (índice de reatividade >1), círculos em cinza indicam negatividade (índice de reatividade ≤1).

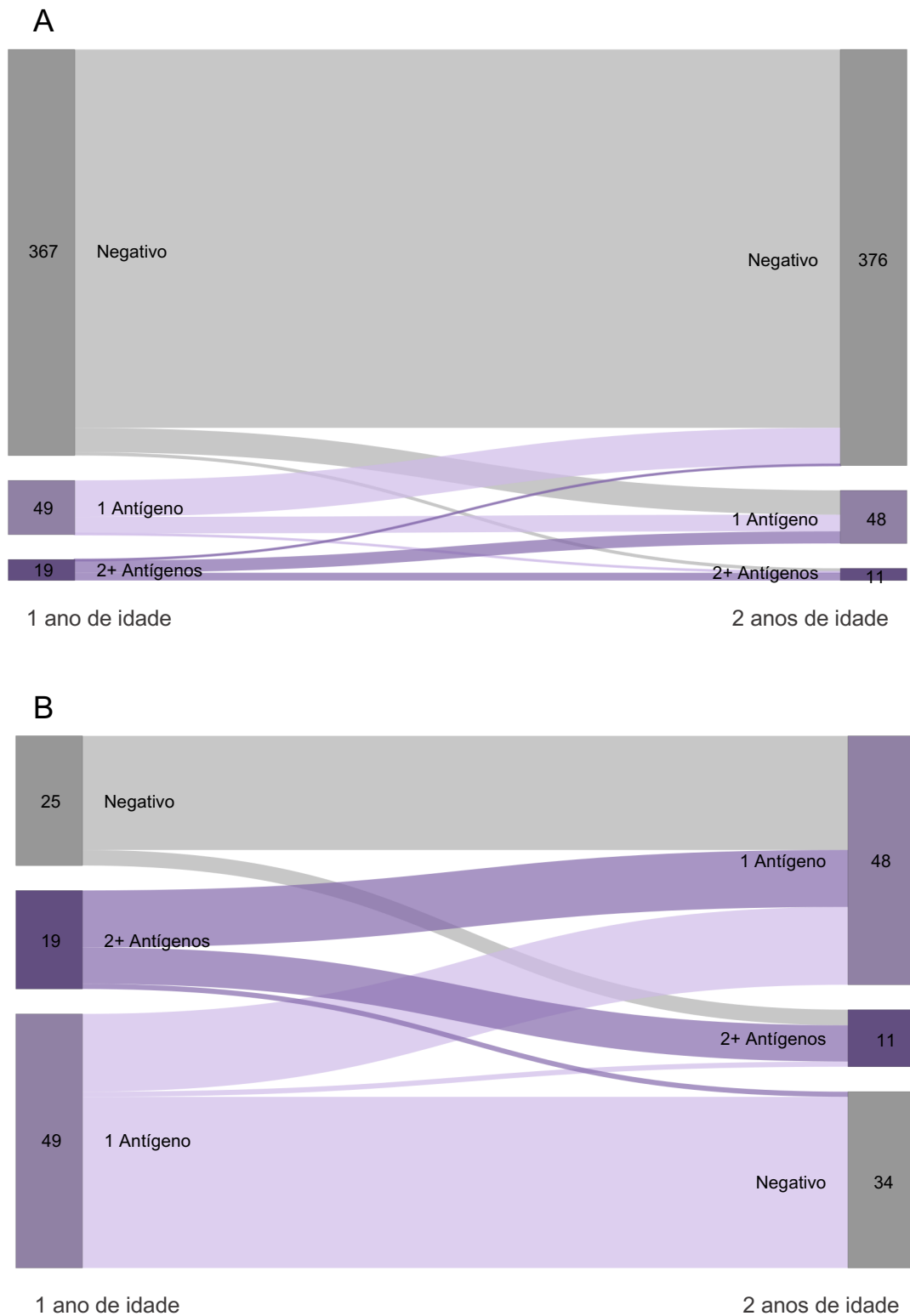


Figura 11 Distribuição de crianças de acordo com ausência ou presença de anticorpos IgG para 1 ou ≥ 2 antígenos da fase sanguínea de *Plasmodium vivax* (PvAMA1, PvDBP ou PvMSP119)
 (A) Todos os participantes avaliados (n = 435), (B) participantes que soroconverteram ou sororreverteram entre as visitas de 1 e 2 anos (n = 93).

4.2.2.1 Evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax*

Identificamos evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* no primeiro ano de vida - positividade para ≥ 2 antígenos na visita de um ano de idade - em 19 crianças (4,4%, IC 95% 2,8 - 6,8%). Nos primeiros dois anos de vida, 23 crianças (5,3%, IC 95% 3,5 - 7,8%) tiveram evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* - positividade para ≥ 2 antígenos na visita de um ou dois anos de idade.

Quando avaliamos as exposições ao *P. vivax* identificadas por sorologia ou notificação no sistema SIVEP-Malária nas 435 crianças que participaram da avaliação sorológica, observamos que a maior parte das infecções por *P. vivax* no início da vida permanecem invisíveis ao sistema de saúde brasileiro: não são diagnosticadas, tratadas e notificadas no sistema SIVEP-Malária. No primeiro ano de vida, 77,3% ($n = 17/22$) das crianças com exposição ao *P. vivax* identificada neste estudo não tiveram nenhum caso de malária vivax notificado no sistema SIVEP-Malária. Nos dois primeiros anos de vida, 50,0% ($n = 15/30$) das crianças com exposição ao *P. vivax* identificada neste estudo não tiveram nenhuma notificação de malária vivax no sistema SIVEP-Malária (Figura 12).

Nos primeiros dois anos de vida, 7 crianças tiveram malária vivax notificada no sistema SIVEP-Malária sem evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* (Figura 12). Neste estudo, as limitações quanto à sensibilidade da sorologia para identificar exposições prévias ao *P. vivax* são claras e não permitem que a prevalência de infecções por *P. vivax* nos primeiros 24 meses de vida da população que participou da avaliação sorológica seja estimada.

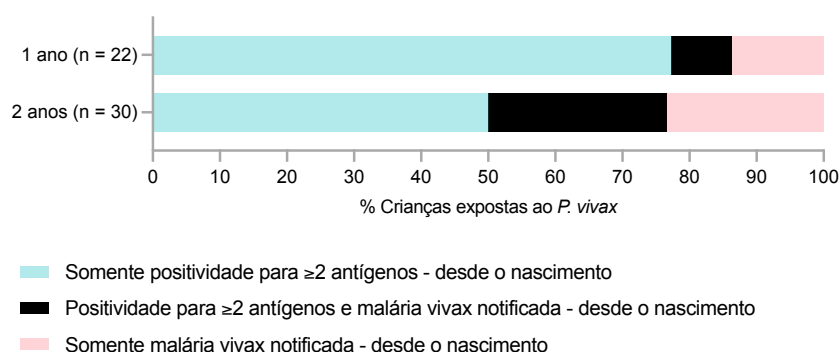


Figura 12 Crianças que participaram da avaliação sorológica e tiveram exposições ao *Plasmodium vivax* identificadas por sorologia ou notificação no sistema SIVEP-Malária (n = 22 no primeiro ano de vida, n = 30 nos primeiros dois anos de vida)

Em verde água, crianças com evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* (presença de anticorpos IgG para ≥2 antígenos da fase sanguínea de *Plasmodium vivax* - PvAMA1, PvDBP ou PvMSP119) (n = 17 primeiro ano de vida, n = 15 primeiros dois anos de vida); em preto, crianças com ao menos um caso de malária vivax notificado no sistema SIVEP-Malária e com evidência sorológica de exposição prévia ao *P. vivax* (n = 2 primeiro ano de vida, n = 8 primeiros dois anos de vida); em rosa, crianças com ao menos um caso de malária vivax notificado no sistema SIVEP-Malária (n = 3 primeiro ano de vida, n = 7 primeiros dois anos de vida). Os dados se referem ao período do nascimento até a visita de 1 ano ou 2 anos de idade. Aos 2 anos foram incluídos tanto os dados sorológicos da visita de 2 anos como de 1 ano de idade.

4.3 FATORES ASSOCIADOS COM INFECÇÕES POR *PLASMODIUM* NOS PRIMEIROS DOIS ANOS DE VIDA

Uma vez que tínhamos em mãos os dados de histórico de notificação de casos de malária nos primeiros dois anos de vida da população deste estudo (n = 1539), e que tínhamos a informação de evidência sorológica de exposição prévia ao *P. vivax* para um extrato da população (n = 435), investigamos fatores associados com infecções por *Plasmodium* nos primeiros dois anos de vida.

4.3.1 Fatores associados com notificação de malária no sistema SIVEP-Malária

Observamos maior incidência de casos de notificação de malária nos primeiros dois anos de vida nas crianças residentes na região rural (Figura 13). Durante a gestação não foi diferente: gestantes que moravam na região rural de Cruzeiro do Sul foram mais expostas à malária quando comparadas com gestantes que residiam na área urbana da cidade, razão de *odds* ajustada de 3,40 (IC 95% 2,13 - 5,44, P = < 0,001) (93).

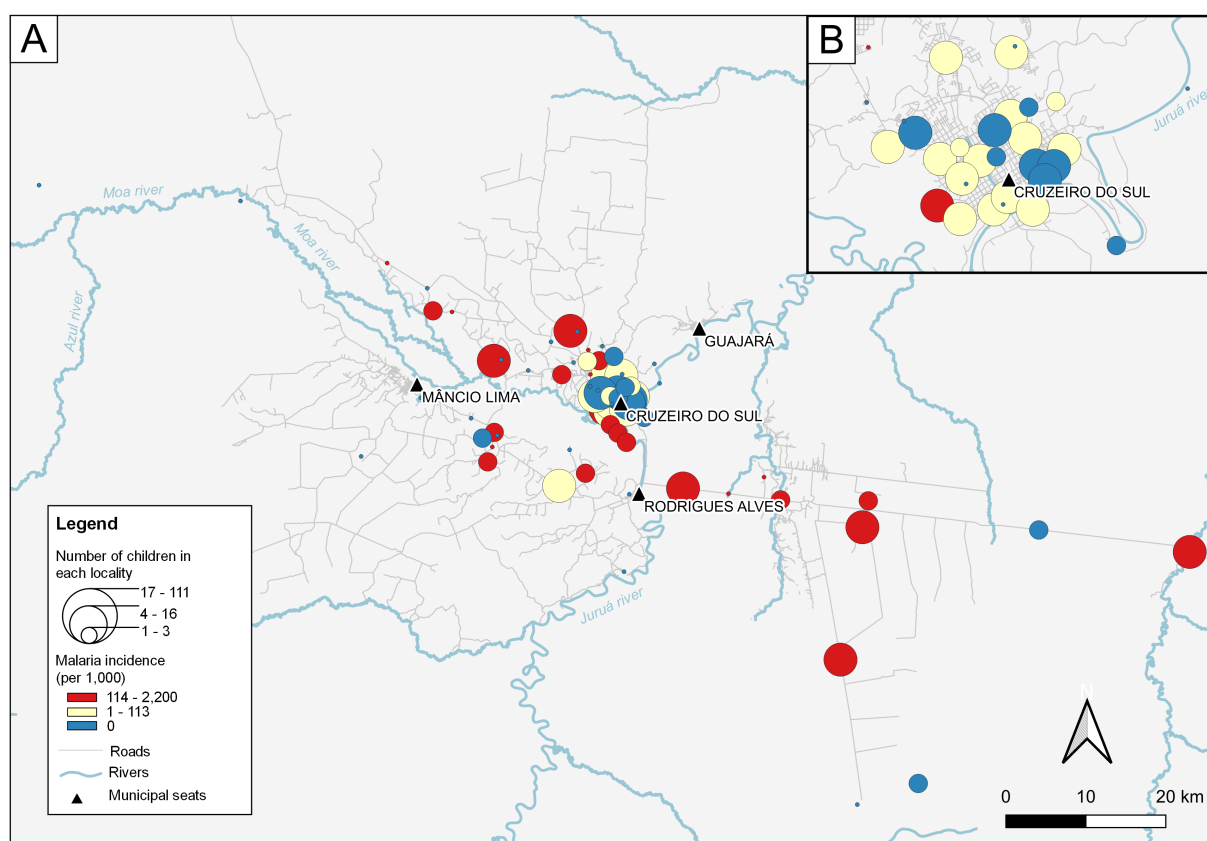


Figura 13 Incidência de casos de malária de acordo com a região de moradia

(A) Mapa da região do Vale do Alto Juruá com 81 localidades de residência dos participantes deste estudo ($n = 1494$). As localidades foram representadas por círculos de tamanhos proporcionais ao número de crianças participantes deste estudo residentes no local. As cores dos círculos representam a incidência de malária na população residente ao longo dos primeiros 24 meses de vida (maiores incidências nas cores mais quentes). Estradas e ruas estão representadas em cinza, rios em azul. (B) Detalhe da cidade de Cruzeiro do Sul.

Para investigar os fatores associados com notificação de malária nos primeiros 24 meses de vida, fizemos regressão binomial negativa multinível com a variável IPA na região de moradia estratificada em quintis como variável contextual. O desfecho foi o número de casos de malária de qualquer espécie, ou malária vivax em específico, diagnosticados nos primeiros dois anos de vida. Incluímos nessa análise todas as crianças autorizadas a participar do estudo MINA-Brasil que tinham disponíveis as informações para busca de notificação de casos de malária no banco de dados do sistema SIVEP-Malária, e a informação de IPA na região de moradia $n = 1494$.

A exposição à malária na vida intrauterina, presente em 11,9% ($n = 178/1494$) dos participantes deste estudo, foi um dos principais fatores associados com risco de notificação de malária nos primeiros dois anos de vida, IRR na análise ajustada de 2,32 (IC 95% 1,26 - 4,25, $P = 0,007$). Ser beneficiário do Bolsa Família, um marcador de pobreza, se associou com

maior risco de malária, IRR na análise ajustada de 1,94 (IC 95% 1,12 - 3,35, $P = 0,018$). Filhos de mães com uma gestação prévia, quando comparados com filhos de mães primigestas, e crianças do quartil menos pobre, quando comparadas com as mais pobres, tiveram menos risco de notificação de malária: IRR na análise ajustada de 0,29 (IC 95% 0,13 - 0,62, $P = 0,001$) e 0,17 (IC 95% 0,06 - 0,47, $P = 0,001$) (Tabela 3).

Investigamos também a associação entre IPA na região de moradia e o risco de notificação de malária nos primeiros dois anos de vida. Agora, o modelo de regressão binomial negativa não foi multinível, e IPA na região de moradia entrou como variável independente. Observamos que o risco de malária aumenta substancialmente nos quintis superiores, passando de IRR na análise ajustada de 4,70 (IC 95% 1,57 - 14,06, $P = 0,006$) no quarto quintil, para 20,72 (IC 95% 7,09 - 60,52, $P = < 0,001$) no quintil superior, com uma grande amplitude no IC (Tabela 4).

Tabela 3 Regressão binomial negativa multinível para avaliação de fatores associados com o número de notificações de malária e malária vivax em específico nos primeiros 24 meses de vida ($n = 1494$)

Desfecho: malária qualquer espécie						Desfecho: malária vivax				
Variáveis	n ^a	IRR ^b	(IC 95%)		P	IRR ^b	(IC 95%)		P	
Índice de riqueza (quintil)										
1 (mais pobre)	341	Ref.				Ref.				
2	358	0.64	(0.34	1.19)	0.159	0.66	(0.34	1.26)	0.206	
3	363	0.71	(0.38	1.36)	0.304	0.76	(0.39	1.48)	0.424	
4	364	0.17	(0.06	0.47)	0.001	0.20	(0.07	0.55)	0.002	
Bolsa Família ^d										
não	821	Ref.				Ref.				
sim	605	1.94	(1.12	3.35)	0.018	1.91	(1.09	3.34)	0.024	
Malária na gestação										
não	1316	Ref.				Ref.				
sim	178	2.32	(1.26	4.25)	0.007	2.52	(1.36	4.66)	0.003	
Gestações prévias										
primigesta	570	Ref.				Ref.				
1	365	0.29	(0.13	0.62)	0.001	0.28	(0.13	0.62)	0.002	
2	203	0.73	(0.34	1.55)	0.410	0.79	(0.37	1.70)	0.549	
3	118	0.59	(0.23	1.47)	0.255	0.52	(0.20	1.35)	0.177	
>= 4	170	1.06	(0.51	2.22)	0.873	1.11	(0.52	2.37)	0.778	

^aNúmero total de cada variável pode não ser igual a 1494 por conta de *missing*

^bIRR = *Incidence Rate Ratio*

Variável IPA na região de moradia estratificada em quintis foi incluída como variável contextual

Tabela 4 Regressão binomial negativa para avaliação de fatores associados com o número de notificações de malária e malária vivax em específico nos primeiros 24 meses de vida (n = 1494)

Variáveis	n ^a	Desfecho: malária qualquer espécie				Desfecho: malária vivax			
		IRR ^b	(IC 95%)		P	IRR ^b	(IC 95%)		P
Índice de riqueza (quintil)									
1 (mais pobre)	341	Ref.				Ref.			
2	358	0.64	(0.34	1.20)	0.164	0.66	(0.35	1.27)	0.215
3	363	0.73	(0.39	1.39)	0.344	0.79	(0.41	1.53)	0.485
4	364	0.17	(0.06	0.48)	0.001	0.21	(0.07	0.58)	0.003
Bolsa Família ^d									
não	821	Ref.				Ref.			
sim	605	1.92	(1.11	3.31)	0.020	1.88	(1.07	3.29)	0.027
IPA ^e									
1 (menor)	300	Ref.				Ref.			
2	312	2.65	(0.84	8.38)	0.096	3.13	(0.91	10.80)	0.071
3	292	2.65	(0.84	8.34)	0.097	3.32	(0.97	11.40)	0.057
4	323	4.70	(1.57	14.06)	0.006	4.98	(1.50	16.51)	0.009
5 (maior)	267	20.72	(7.09	60.52)	<0.001	22.73	(7.08	73.01)	<0.001
Malária na gestação									
não	1316	Ref.				Ref.			
sim	178	2.20	(1.21	4.02)	0.010	2.39	(1.30	4.40)	0.005
Gestações prévias									
primigesta	570	Ref.				Ref.			
1	365	0.28	(0.13	0.61)	0.001	0.27	(0.12	0.61)	0.002
2	203	0.72	(0.34	1.53)	0.393	0.78	(0.37	1.67)	0.528
3	118	0.57	(0.23	1.43)	0.231	0.50	(0.19	1.30)	0.153
>= 4	170	1.04	(0.50	2.17)	0.913	1.09	(0.52	2.32)	0.815

^aNúmero total de cada variável pode não ser igual a 1494 por conta de *missing*

^bIRR = *Incidence Rate Ratio*

4.3.2 Anticorpos maternos adquiridos na vida intrauterina: um possível fator protetor contra malária vivax no início da vida

A baixa incidência de notificação de malária no início da vida na população deste estudo pode estar associada com a presença de anticorpos IgG maternos adquiridos na vida intrauterina. Assim, buscamos investigar a associação entre a presença de anticorpos maternos contra as fases sanguíneas de *P. vivax* adquiridos na vida intrauterina e o risco subsequente de notificação de malária vivax. Fizemos avaliação sorológica de amostras maternas (sangue venoso) e do recém-nascido (sangue de cordão umbilical) coletadas no parto para os três antígenos da fase sanguínea de *P. vivax* utilizados neste estudo: PvDBP, PvMSP119 e PvAMA-1.

4.3.2.1 Anticorpos contra antígenos das fases sanguíneas de *P. vivax* e risco de malária vivax materna nos primeiros 24 meses pós-parto

O primeiro passo para investigar a associação entre anticorpos adquiridos na vida intrauterina e o risco subsequente de malária foi a caracterização da presença de anticorpos IgG anti-PvDBP, anti-PvMSP119 e anti-PvAMA1 nas parturientes deste estudo. Participaram da avaliação sorológica as mães que possuíam amostra disponível de sangue venoso coletada no dia do parto ($n = 1095$).

A prevalência de positividade de anticorpos em amostras de sangue venoso materno coletadas no parto anti-PvAMA1 foi de 31,8%, anti-PvDBP 31,7%, e anti-PvMSP119 44,4%. Observamos níveis mais altos de anticorpos nas parturientes com diagnóstico molecular (qPCR) (93) positivo para *P. vivax* – $P < 0,0001$ para todos os antígenos no teste de Mann-Whitney (Figura 14 A). O teste do qui-quadrado para tendência linear de Mantel-Haenszel indicou aumento da prevalência de anticorpo anti-PvAMA1 com o aumento da idade ($P = 0,015$) (Figura 14 B). A prevalência de anticorpos anti-PvDBP e anti-PvMSP119 não se associou com a idade materna (Figura 14 B). Observamos nas mães deste estudo associação entre níveis altos de anticorpos no momento do parto (quintis superiores) e aumento de risco de notificação de malária vivax nos primeiros 12 meses pós-parto (Figura 14 C).

Fizemos análise de sobrevivência de riscos proporcionais de Cox para o desfecho de primeiro caso de notificação de malária vivax materna no primeiro e no segundo ano pós-parto. Observamos associação significativa entre níveis altos de anticorpos e aumento de risco de notificação de malária vivax nos primeiros 12 meses pós-parto para todos os antígenos avaliados (Tabela 5). É possível que o maior risco de notificação de malária vivax observado em mães com altos IR no parto esteja associado com infecções recentes de malária vivax na gestação e com episódios de recaídas no período pós-parto. Gestantes não devem receber primaquina como tratamento para malária vivax e isso torna essa população particularmente vulnerável a recaídas. No segundo ano não houve associação entre nível de anticorpos no parto e risco subsequente de malária (mães com diagnóstico de malária no primeiro ano foram excluídas da análise no segundo ano) (Tabela 5).

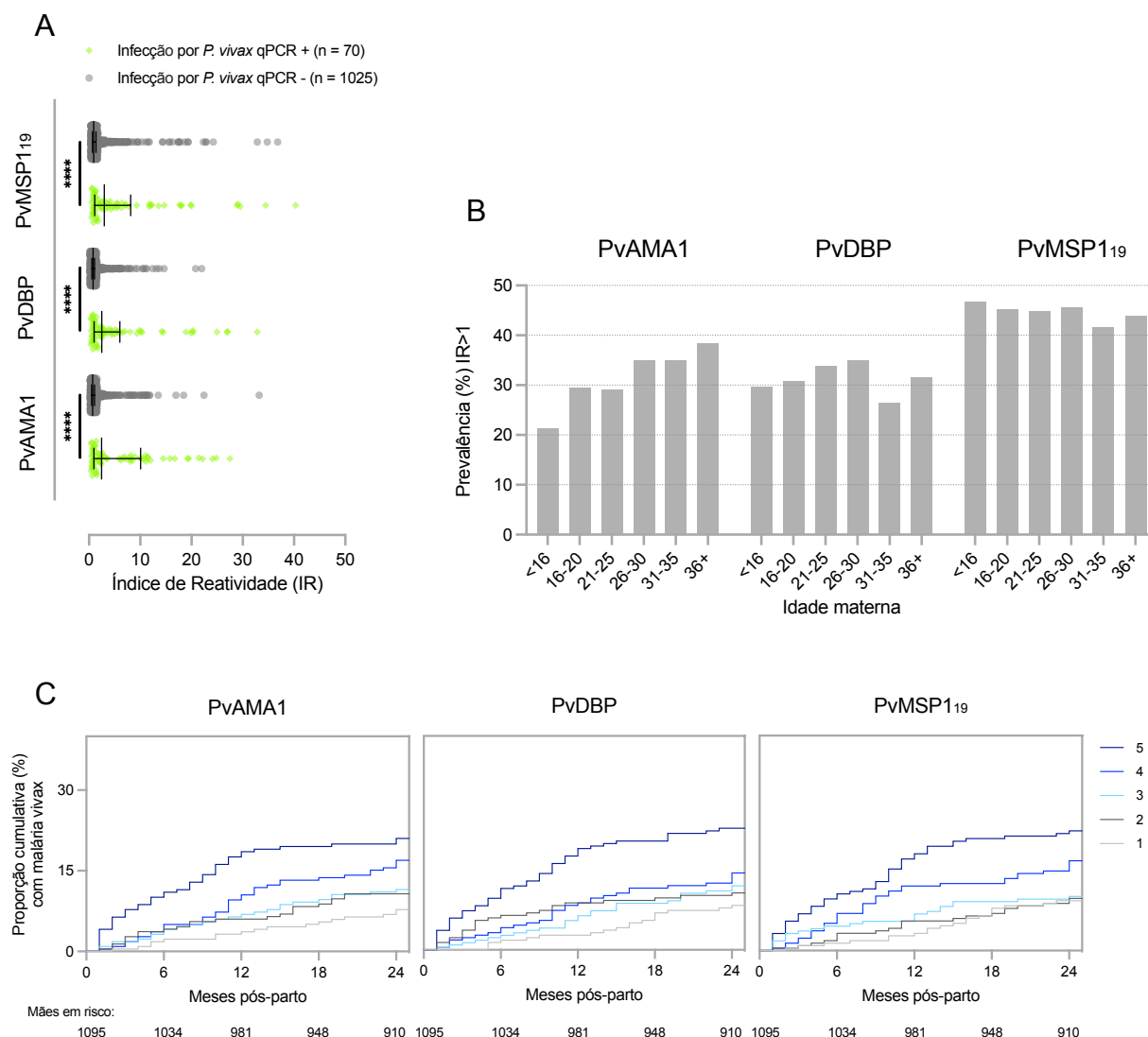


Figura 14 Anticorpos IgG anti-PvDBP, anti-PvMSP119 e anti-PvAMA1 nas parturientes deste estudo e risco subsequente de diagnóstico de malária vivax (n = 1095; amostras coletadas no parto)

(A) Comparação entre níveis de anticorpos anti-PvAMA1, anti-PvDBP e anti-PvMSP-119 em parturientes infectadas (n = 70) e não infectadas (n = 1025) por *Plasmodium vivax* - diagnóstico por qPCR (93); barras na mediana e no intervalo interquartil; **** = $P < 0,0001$ no teste de Mann-Whitney. (B) Prevalência de anticorpos maternos anti-PvAMA1, anti-PvDBP e anti-PvMSP-119 de acordo com a idade da parturiente. Foram consideradas positivas as amostras com Índice de Reatividade (IR) > 1: <16 n = 47, 16-20 n = 312, 21-25 n = 274, 26-30 n = 226, 31-35 n = 163, 36+ n = 73. (C) Incidência cumulativa de notificação de malária vivax materna nos primeiros 24 meses pós-parto de acordo com os níveis de anticorpos anti-PvAMA1, anti-PvDBP e anti-PvMSP-119 estratificados em quintis (1 = IR mais baixo). Mulheres diagnosticadas com *P. falciparum* foram censuradas.

Tabela 5 Regressão de riscos proporcionais de Cox para primeiro caso de notificação de malária vivax nas mães dos participantes deste estudo no primeiro e no segundo ano pós-parto (n = 1095)

População	Desfecho	Antígeno	HR ^b conforme quintil de nível de anticorpo		IC 95%		P
Mães (n = 1095)	Tempo para primeiro caso de notificação de malária vivax nos 12 meses pós-parto (96 falhas) ^a	PvAMA1	1	Ref.			
			2	1.72	(0.68	4.31)	0.251
			3	1.92	(0.77	4.76)	0.160
			4	2.36	(1.00	5.58)	0.050
			5	2.94	(1.26	6.86)	0.013
		PvDBP	1	Ref.			
			2	3.27	(1.30	8.21)	0.012
			3	1.79	(0.67	4.80)	0.244
			4	2.69	(1.07	6.80)	0.036
			5	3.75	(1.54	9.13)	0.004
		PvMSP1 ₁₉	1	Ref.			
			2	2.02	(0.75	5.42)	0.162
			3	2.24	(0.85	5.90)	0.104
			4	3.43	(1.40	8.41)	0.007
			5	3.67	(1.51	8.94)	0.004
Mães (n = 981) ^c	Tempo para o primeiro caso de notificação de malária vivax nos 12-24 meses pós-parto (51 falhas) ^a	PvAMA1	1	Ref.			
			2	0.99	(0.41	2.38)	0.977
			3	1.13	(0.48	2.67)	0.778
			4	1.48	(0.66	3.32)	0.345
			5	0.53	(0.18	1.63)	0.269
		PvDBP	1	Ref.			
			2	0.34	(0.11	1.05)	0.061
			3	1.18	(0.54	2.55)	0.683
			4	1.09	(0.50	2.41)	0.823
			5	0.71	(0.28	1.80)	0.472
		PvMSP1 ₁₉	1	Ref.			
			2	0.59	(0.25	1.38)	0.223
			3	0.63	(0.27	1.46)	0.281
			4	0.70	(0.31	1.59)	0.392
			5	0.66	(0.27	1.58)	0.350

^a Análise de riscos proporcionais de Cox ajustada para índice de riqueza (quartis), IPA no local de moradia (variável contínua), malária na gestação (sim/não).

^b HR = *Hazard Ratio*

^c Mães diagnosticadas com malária (provocada por qualquer espécie de *Plasmodium*) nos primeiros 12 meses foram excluídas da análise 12-24 meses

Neste estudo estimamos os níveis de anticorpos IgG totais contra os antígenos PvAMA1, PvDBP e PvMSP119; não avaliamos a atividade biológica desses anticorpos. Sabemos que nem todos os anticorpos gerados contra *Plasmodium* são protetores contra a infecção, e que possivelmente não tenhamos conseguido identificar a presença de

anticorpos protetores somente com sorologia de IgG total, sendo este um dos motivos pelos quais não sugerimos que anticorpos contra os antígenos avaliados não tenham atividade protetora contra malária vivax.

4.3.2.2 Anticorpos maternos contra antígenos das fases sanguíneas de P. vivax adquiridos na vida intrauterina e risco de malária vivax nos primeiros 24 meses de vida

Avaliamos a correlação de IR de 101 pares de amostras coletadas no parto de sangue venoso materno e de sangue de cordão umbilical. O coeficiente de correlação de Spearman foi de 0,801 para anticorpos anti-PvDBP, 0,813 anti-PvAMA1 e 0,858 anti-PvMSP119, $P < 0,0001$ para todos os antígenos (Figura 15 A). Porque neste estudo a disponibilidade de amostras de sangue de cordão umbilical é menor do que a de sangue venoso materno, e porque houve correlação entre os níveis de anticorpos maternos e os níveis de anticorpos presentes no cordão umbilical, optamos por usar nas análises de sobrevivência de malária infantil o IR de anticorpos do sangue venoso materno como referência de níveis de anticorpos maternos adquiridos na vida intrauterina.

Não houve associação entre níveis de anticorpos maternos e risco de malária nos primeiros 24 meses de vida - análise de sobrevivência com o modelo de riscos proporcionais de Cox para o desfecho de primeiro caso de notificação de malária vivax nos primeiros 24 meses de vida ($n = 1095$) (Figura 15 B, Tabela 6). Para investigar a associação entre anticorpos IgG maternos e risco de malária infantil, o ideal teria sido fazer a análise de sobrevivência restrita aos primeiros 6 meses de vida. Mas a incidência de malária no primeiro ano de vida na população deste estudo foi baixa e não foi possível fazer a análise cobrindo somente os primeiros seis meses pós-parto. Assim, considerando as limitações deste estudo, nossos resultados não são suficientes para sugerir ausência de associação entre anticorpos maternos anti-PvDBP, anti-PvAMA1 e anti-PvMSP119 adquiridos na vida intrauterina e proteção contra malária vivax no início da vida.

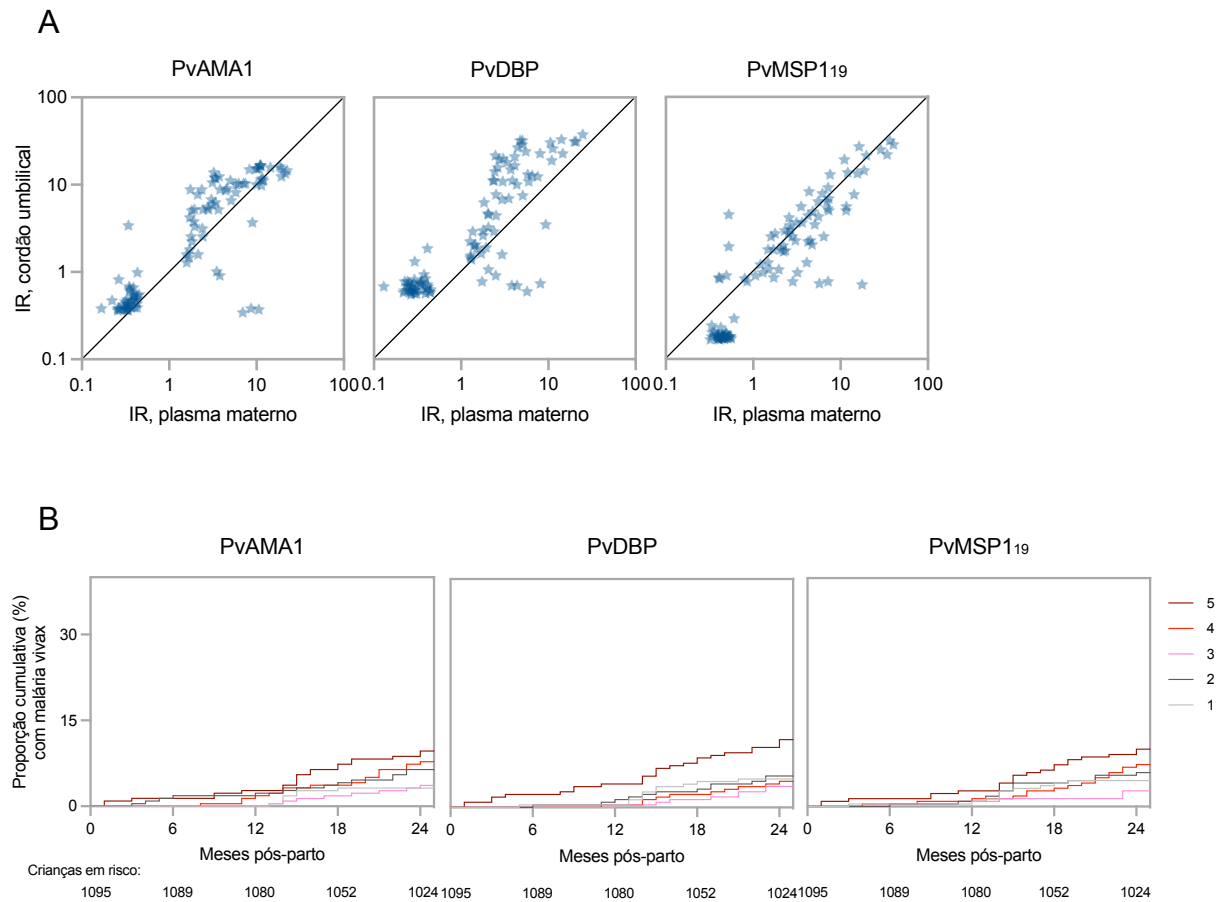


Figura 15 Anticorpos IgG maternos anti-PvDBP, anti-PvMSP119 e anti-PvAMA1 e risco subsequente de diagnóstico de malária vivax (n = 1095)

(A) *Scatter plot* de Índice de Reatividade (IR) de anticorpos anti-PvAMA1, anti-PvDBP e anti-PvMSP-119 maternos e de cordão umbilical (n = 101 pares). (B) Incidência cumulativa de notificação de malária vivax nos primeiros 24 meses de vida de acordo com os níveis de anticorpos maternos anti-PvAMA1, anti-PvDBP e anti-PvMSP119 estratificados em quintis (1 = IR mais baixo). Crianças diagnosticadas com *Plasmodium falciparum* foram censuradas.

Tabela 6 Regressão de riscos proporcionais de Cox para primeiro caso de notificação de malária vivax nos primeiros 24 meses de vida (n = 1095)

População	Desfecho	Antígeno	HR ^b conforme quintil de nível de anticorpo		IC 95%	P
Crianças (n = 1095)	Tempo para o primeiro caso de notificação de malária vivax nos primeiros 24 meses de vida (67 falhas) ^a	PvAMA1	1	Ref.		
			2	1.56	(0.62 3.90)	0.345
			3	1.05	(0.38 2.91)	0.919
			4	1.47	(0.59 3.66)	0.405
			5	1.09	(0.43 2.78)	0.853
		PvDBP	1	Ref.		
			2	1.08	(0.47 2.47)	0.851
			3	0.51	(0.20 1.28)	0.151
			4	0.71	(0.30 1.70)	0.445
			5	0.97	(0.45 2.10)	0.948
		PvMSP119	1	Ref.		
			2	1.09	(0.47 2.51)	0.843
			3	0.46	(0.17 1.28)	0.137
			4	1.01	(0.45 2.29)	0.972
			5	0.81	(0.36 1.84)	0.621

^a Análise de riscos proporcionais de Cox ajustada para índice de riqueza (quartis), IPA no local de moradia (variável contínua), malária na gestação (sim/não), número de gestações prévias (0, 1, 2, 3, 4+), consumo de álcool na gestação (sim/não).
^b HR = Hazard Ratio

4.3.3 Fatores associados com evidência sorológica de exposição às fases sanguínea de *P. vivax*

Investigamos fatores associados com evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* - positividade para anticorpos IgG contra ≥ 2 antígenos (PvDBP, PvMSP119 ou PvAMA1) nas visitas de um ou dois anos de idade. Optamos por usar modelos de regressão multinível de Poisson com variância robusta para o desfecho binário positivo/negativo (111). A variável IPA na região de moradia estratificada em quintis foi incluída no modelo como variável contextual. Participaram da análise as crianças com informação disponível de IPA na região de moradia (n = 431).

Investigamos também fatores associados com notificação de malária vivax na mesma população (n = 431), com o mesmo método estatístico e com variáveis de ajuste selecionadas a partir do mesmo modelo conceitual hierárquico (Figura 7 A). Assim, obtivemos dados comparáveis para os dois desfechos: (a) evidência sorológica de infecção por *P. vivax* nos primeiros 24 meses de vida, presente em 23 crianças (5,3%), e (b) ao

menos um caso de malária vivax notificado no sistema SIVEP-Malária nos primeiros dois anos de vida, presente em 15 (3,4%) crianças.

A exposição à malária na vida intrauterina, presente em 7,7% ($n = 33/431$) das crianças que participaram da análise, foi o principal fator associado com aumento de risco de evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* (Tabela 7). Aleitamento materno prolongado, por ≥ 12 meses, presente em 68,2% ($n = 292/428$) das crianças com essa informação disponível, foi fator de proteção para o desfecho de evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* (Tabela 7), mas não teve associação com o desfecho de notificação de malária vivax nos primeiros 24 meses de vida (Tabela 8).

Investigamos a associação entre aleitamento materno prolongado e infecção por *P. vivax* com uma definição mais abrangente de “evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax*”. Dessa vez, consideramos expostas as crianças com positividade para anticorpos IgG contra ao menos um dos antígenos avaliados (PvDBP, PvMSP119 ou PvAMA1) nas visitas de um ou dois anos de idade. Com a definição mais abrangente, a positividade passou de 5,3% ($n = 23$, positivas para ≥ 2 antígenos investigados) para 21,4% ($n = 92$, positivas para ≥ 1 antígenos investigados). O aleitamento materno prolongado permaneceu como fator protetor (Tabela 9).

Tabela 7 Regressão multinível de Poisson com variância robusta para investigação de fatores associados com a presença de anticorpos IgG para ≥ 2 antígenos da fase sanguínea de *P. vivax* em crianças com 1 ou 2 anos de idade (n = 431) - desfecho binário positivo/negativo

Variáveis	n positivos/total	Não ajustado				Ajustado			
		PR ^a	IC 95%		P	PR	IC 95%		P
Idade (meses)	23/431	1.12	(0.88	1.43)	0.341	1.14	(0.86	1.50)	0.357
Índice de riqueza (quartil)									
1 (mais pobre)	6/93	Ref.				Ref.			
2	6/114	0.82	(0.27	2.45)	0.717	1.04	(0.42	2.57)	0.934
3	8/113	1.10	(0.39	3.05)	0.859	1.47	(0.50	4.34)	0.488
4 (menos pobre)	3/111	0.42	(0.11	1.63)	0.210	0.45	(0.11	1.79)	0.257
Malária na gestação									
Não	19/398	Ref.				Ref.			
Sim	4/33	2.54	(0.92	7.04)	0.073	2.61	(1.27	5.36)	0.009
Duração da amamentação									
<12 meses	15/136	Ref.				Ref.			
≥12 meses	8/292	0.25	(0.11	0.57)	0.001	0.20	(0.13	0.31)	<0.001
IPA (quartil)									
1 (menor)	5/101	Ref.							
2	3/104	0.58	(0.14	2.38)	0.452				
3	6/91	1.33	(0.42	4.22)	0.626				
4	1/83	0.24	(0.03	2.05)	0.193				
5 (maior)	8/52	3.11	(1.07	9.04)	0.037				

^a PR = Prevalence Ratio

No modelo ajustado a variável IPA na região de moradia estratificada em quintis foi incluída como variável contextual

Tabela 8 Regressão multinível de Poisson com variância robusta para investigação de fatores associados com ao menos um caso de malária vivax notificado nos primeiros 24 meses de vida (n = 431) - desfecho binário positivo/negativo

Variáveis	n positivos/total	Não ajustado				Ajustado			
		PR ^a	IC 95%		P	PR	IC 95%		P
Idade (meses)	15/431	1.12	(0.79	1.58)	0.522	1.22	(0.95	1.57)	0.127
Índice de riqueza (quartil)									
1 (mais pobre)	4/93	Ref.				Ref.			
2	6/114	1.22	(0.36	4.21)	0.749	1.45	(0.90	2.32)	0.123
3	4/113	0.82	(0.21	3.21)	0.779	1.41	(0.25	7.83)	0.697
4 (menos pobre)	1/111	0.21	(0.02	1.85)	0.159	0.36	(0.09	1.47)	0.154
Malária na gestação									
Não	9/398	Ref.				Ref.			
Sim	6/33	8.04	(3.04	21.24)	<0.001	5.93	(2.16	16.26)	0.001
Anemia materna no parto									
Não	4/256	Ref.				Ref.			
Sim	11/156	4.51	(1.46	13.94)	0.009	3.45	(1.43	8.32)	0.006
Duração da amamentação									
<12 meses	3/136	Ref.				Ref.			
≥12 meses	12/292	1.86	(0.53	6.51)	0.329	1.33	(0.17	10.27)	0.788
IPA (quartil)									
1 (menor)	1/101	Ref.							
2	1/104	0.97	(0.06	15.37)	0.983				
3	3/91	3.33	(0.35	31.53)	0.294				
4	2/83	2.43	(0.22	26.44)	0.465				
5 (maior)	8/52	15.54	(1.99	121.20)	0.009				

^a PR = *Prevalence Ratio*

No modelo ajustado a variável IPA na região de moradia estratificada em quintis foi incluída como variável contextual

Tabela 9 Regressão multinível de Poisson com variância robusta para investigação de fatores associados com a presença de anticorpos IgG para ≥ 1 antígenos da fase sanguínea de *P. vivax* em crianças com 1 ou 2 anos de idade (n = 431) - desfecho binário positivo/negativo

Variáveis	n positivos/total	Não ajustado				Ajustado			
		PR ^a	IC 95%		P	PR	IC 95%		P
Idade (meses)	92/431	1.10	(0.97	1.24)	0.156	1.11	(0.96	1.27)	0.152
Índice de riqueza (quartil)									
1 (mais pobre)	20/93	Ref.				Ref.			
2	20/114	0.82	(0.47	1.42)	0.473	0.85	(0.40	1.82)	0.676
3	26/113	1.07	(0.64	1.79)	0.797	1.12	(0.60	2.09)	0.734
4 (menos pobre)	26/111	1.09	(0.65	1.82)	0.745	1.08	(0.66	1.75)	0.765
Malária na gestação									
Não	83/398	Ref.				Ref.			
Sim	9/33	1.31	(0.73	2.36)	0.373	1.49	(0.93	2.39)	0.101
Duração da amamentação									
<12 meses	45/136	Ref.				Ref.			
≥ 12 meses	46/292	0.48	(0.33	0.68)	<0.001	0.48	(0.43	0.53)	<0.001
IPA (quintil)									
1 (menor)	21/101	Ref.							
2	17/104	0.79	(0.44	1.40)	0.415				
3	21/91	1.11	(0.65	1.90)	0.703				
4	17/83	0.99	(0.56	1.74)	0.959				
5 (maior)	16/52	1.48	(0.85	2.59)	0.169				

^a PR = Prevalence Ratio

No modelo ajustado a variável IPA na região de moradia estratificada em quintis foi incluída como variável contextual

4.4 INFECÇÕES POR *PLASMODIUM* E ANEMIA AOS DOIS ANOS DE IDADE

A associação entre malária vivax e anemia é conhecida, e o impacto da infecção por *P. vivax* no nível de hemoglobina pode ser particularmente grave em crianças (11,16,17,120). Os estudos que investigaram malária vivax e anemia na primeira infância foram realizados principalmente no Sudeste Asiático, em regiões de alta endemicidade para o parasito. Nessas regiões, a anemia grave provocada por malária vivax é uma causa importante de hospitalização e morbidade no início da vida (16,17,23,120).

Avaliamos a associação entre: (a) notificação de malária nos primeiros 24 meses de vida (n = 860) e (b) evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* (n = 428) e o risco de anemia aos dois anos de idade. Fizemos modelos de regressão de Poisson com variância robusta para o desfecho binário com anemia/sem anemia com diferentes exposições envolvendo a notificação de casos de malária e a evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax*.

4.4.1 Notificação de malária no sistema SIVEP-Malária e risco de anemia aos dois anos de idade

Entre as 860 crianças acompanhadas pela coorte MINA-Brasil, 12,6% (n = 108/860) estavam com anemia aos dois anos de idade. Nenhuma criança estava com anemia grave no momento da medição – nível de hemoglobina <70 g/L. Aumento de idade, ser filho de mãe beneficiária do programa Bolsa Família, anemia materna (que na população deste estudo está associada com exposição à malária na gestação (93)) e vômito nos últimos 15 dias, foram fatores de risco para anemia aos dois anos de idade (Tabela 10). Notificação de malária nos primeiros 24 meses de vida, independentemente da espécie de *Plasmodium* diagnosticada e do número de casos notificados, se associou com aumento de risco de anemia aos dois anos de idade, razão de prevalência (PR/*Prevalence Ratio*) na análise ajustada de 1,81 (IC 95% 1,03 - 3,18, P = 0,041) (Tabela 10, Figura 16). Episódios repetidos de malária tiveram efeito negativo mais pronunciado, PR na análise ajustada 2,39 (IC 95% 1,28 - 4,44, P = 0,006) (Figura 16).

Observamos associação entre notificação de malária vivax e aumento de risco de anemia aos dois anos de idade quando a malária vivax foi notificada nos 12 meses prévios à medição – PR na análise ajustada de 2,03 (IC 95% 1,16 - 3,52, P = 0,012) –, e nos casos de notificação de episódios repetidos - PR 2,37 (IC 95% 1,27 - 4,40, P = 0,006) (Figura 16).

Tabela 10 Regressão multinível de Poisson com variância robusta para avaliação de associação entre notificação de malária nos primeiros 24 meses de vida e risco de anemia aos dois anos de idade (n = 860) - desfecho binário com anemia/sem anemia

Variáveis	n com anemia/ n total	Modelo não ajustado				Modelo ajustado			
		PR ^a	IC 95%		P	PR	IC 95%		P
Sexo									
Feminino	46/429	Ref.				Ref.			
Masculino	62/431	1.34	(0.94	1.92)	0.107	1.34	(0.94	1.90)	0.103
Idade (meses)	108/860	1.15	(1.04	1.28)	0.007	1.13	(1.02	1.25)	0.019
Beneficiário do programa Bolsa Família									
Não	42/452	Ref.				Ref.			
Sim	66/408	1.74	(1.21	2.50)	0.003	1.69	(1.18	2.42)	0.005
Anemia materna no parto									
Não	49/494	Ref.				Ref.			
Sim	55/320	1.73	(1.21	2.48)	0.003	1.58	(1.10	2.27)	0.013
Cegueira noturna gestacional									
Não	102/769	Ref.				Ref.			
Sim	6/91	0.50	(0.22	1.10)	0.085	0.46	(0.21	1.01)	0.053
Vômito nos últimos 15 dias									
Não	85/739	Ref.				Ref.			
Sim	23/121	1.65	(1.09	2.51)	0.019	1.68	(1.11	2.53)	0.013
Malária notificada desde o nascimento									
Não	99/828	Ref.				Ref.			
Sim	9/32	2.35	(1.31	4.22)	0.004	1.81	(1.03	3.18)	0.041

^a PR = *Prevalence Ratio*

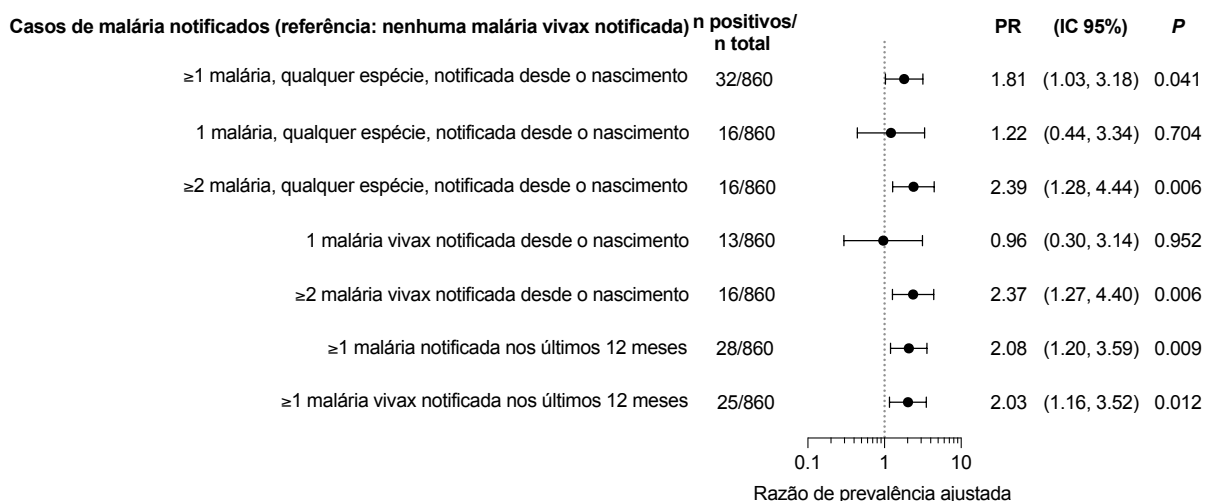


Figura 16 Notificação de malária e anemia aos dois anos de idade - nível de hemoglobina <110g/L (n = 860) Modelo de regressão de Poisson ajustado para sexo, idade, participação no programa Bolsa Família, anemia materna no parto, cegueira noturna materna, vômito nos últimos 15 dias. Foram rodados modelos separados para cada exposição de notificação de malária avaliada.

Fizemos também análise de regressão quantílica para investigar a associação entre exposição à malária nos primeiros 24 meses de vida e nível de hemoglobina aos dois anos das crianças dos percentis 25, 50, e 75 ($n = 860$). Nessa análise, observamos associação entre episódios repetidos de malária nos primeiros dois anos e diminuição no nível de hemoglobina em crianças do percentil 25: -5,42 g/L (IC 95% -10,42 g/L - -0,42 g/L, $P = 0,034$) na análise ajustada (Tabela 11).

Tabela 11 Regressão quantílica ajustada para investigação de associação entre notificação de malária nos primeiros 24 meses de vida e risco de anemia aos dois anos de idade ($n = 860$) - Intervalo de Confiança 95% de *bootstrap* calculado a partir de 500 repetições

Exposição	25º percentil				50º percentil				75º percentil			
	β	IC 95%		P	β	IC 95%		P	β	IC 95%		P
1+ caso de malária	-2.99	(-7.66	1.68)	0.209	-2.23	(-6.98	2.52)	0.358	-2.95	(-6.65	0.75)	0.118
1 caso de malária	4.41	(-2.12	10.94)	0.185	1.62	(-2.48	5.72)	0.438	-2.95	(-6.30	0.40)	0.084
2+ casos de malária	-5.42	(-10.42	-0.42)	0.034	-6.27	(-13.52	0.99)	0.090	-5.66	(-15.84	4.52)	0.275
1+ caso de malária vivax	-2.99	(-7.43	1.45)	0.187	-2.25	(-6.98	2.48)	0.351	-2.77	(-6.97	1.43)	0.196
1 caso de malária vivax	5.05	(-0.69	10.79)	0.084	1.12	(-3.22	5.47)	0.611	-2.77	(-6.90	1.36)	0.188
2+ casos de malária vivax	-5.11	(-10.30	0.09)	0.054	-6.35	(-13.73	1.03)	0.091	-5.65	(-16.65	5.35)	0.314

Análise ajustada para: idade, sexo, índice de riqueza estratificado em quartis, beneficiária do programa Bolsa Família, escolaridade materna, mãe economicamente responsável pelo domicílio, número de habitantes na residência, anemia materna no parto e idade gestacional no parto

4.4.2 Evidência sorológica de exposição prévia ao *P. vivax* e risco de anemia aos dois anos de idade

12,4% ($n = 53/428$) das crianças que participaram da análise para investigar a associação entre evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* e anemia aos dois anos estavam com anemia nesta idade. Observamos que evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* se associou com aumento de risco de anemia aos dois anos de idade, RP na análise ajustada de 2,72 (IC 95% 1,40 - 5,32, $P = 0,003$) (Tabela 12). Porém, quando avaliamos a associação entre evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* e excluímos da análise as 8 crianças que além da sorologia positiva tiveram também casos de malária vivax notificados no sistema SIVEP-Malária, essa associação não foi observada (Figura 17).

A ausência de associação entre as exposições ao *P. vivax* identificadas por sorologia que não foram notificadas no sistema SIVEP-Malária e que, portanto, não receberam antimaláricos como tratamento e possivelmente foram infecções assintomáticas, deve ser interpretada com cuidado. Neste estudo, a sorologia foi uma

metodologia pouco sensível para identificar infecções prévias por *P. vivax*. Além disso, fizemos a avaliação sorológica com somente dois pontos de amostragem (um e dois anos de idade). Soma-se ainda, a impossibilidade de se avaliar a duração e o número de infecções por *P. vivax*. Por isso, a ausência de associação observada neste estudo não sugere que infecções assintomáticas por *P. vivax* no início da vida não sejam um fator de risco para anemia.

Tabela 12 Regressão multinível de Poisson com variância robusta para avaliação de associação entre evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* e risco de anemia aos dois anos de idade (n = 428) - desfecho binário com anemia/sem anemia

		Modelo não ajustado				Modelo ajustado			
Variáveis	n anemia/ n total	PR ^a	IC 95%		P	PR	IC 95%		P
Sexo									
Feminino	20/216	Ref.				Ref.			
Masculino	33/212	1.68	(1.00	2.84)	0.051	1.74	(1.05	2.88)	0.033
Idade (meses)	53/428	1.18	(1.03	1.35)	0.017	1.15	(0.99	1.33)	0.060
Índice de riqueza (quartil)									
1 (mais pobre)	15/93	Ref.				Ref.			
2	15/112	0.83	(0.43	1.61)	0.582	0.75	(0.38	1.47)	0.401
3	12/111	0.67	(0.33	1.36)	0.268	0.62	(0.32	1.21)	0.163
4 (menos pobre)	11/112	0.61	(0.29	1.26)	0.182	0.69	(0.34	1.42)	0.317
Anemia materna no parto									
Não	26/258	Ref.				Ref.			
Sim	26/151	1.71	(1.03	2.83)	0.038	1.65	(1.00	2.72)	0.048
Idade gestacional no parto	53/428	1.16	(1.00	1.35)	0.047	1.14	(0.99	1.31)	0.071
Duração da amamentação									
<12 meses	12/136	Ref.				Ref.			
≥12 meses	41/189	1.61	(0.87	2.96)	0.128	1.91	(1.02	3.55)	0.042
Evidência sorológica de exposição prévia ao <i>P. vivax</i>									
Não	46/405	Ref.				Ref.			
Sim	7/23	2.68	(1.36	5.27)	0.004	2.72	(1.40	5.32)	0.003

^a PR = *Prevalence Ratio*

^a PR = Prevalence Ratio

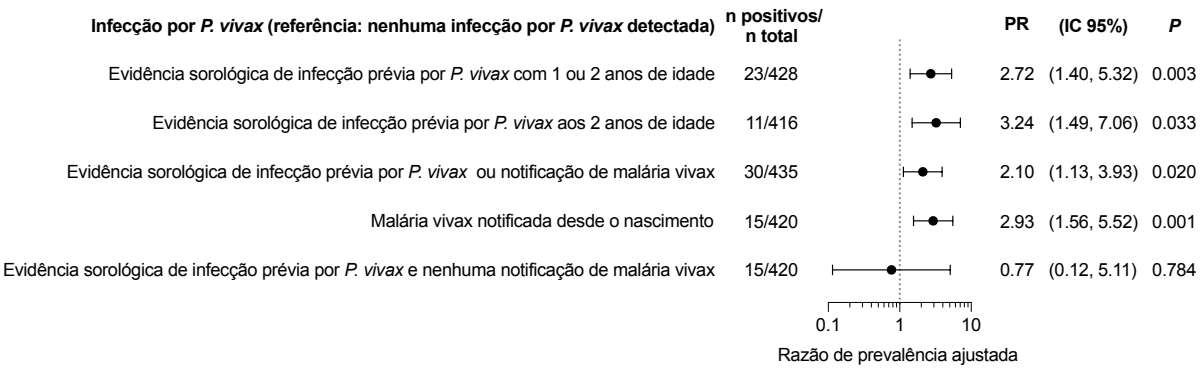


Figura 17 Evidência sorológica de exposição prévia ao *Plasmodium vivax* e anemia aos dois anos de idade - nível de hemoglobina <110g/L (n = 428)
Modelo de regressão de Poisson ajustado para sexo, idade, índice de riqueza, anemia materna, idade gestacional no nascimento e aleitamento materno prolongado (≥12 meses). Foram rodados modelos separados para cada exposição de infecção por *P. vivax* avaliada.

5 DISCUSSÃO

Investigamos a malária nos primeiros 1000 dias de vida dos participantes da coorte MINA-Brasil – da concepção aos dois anos de idade.

Vimos que a malária na gestação, durante a vida intrauterina dos participantes deste estudo, teve impacto negativo para o crescimento fetal e para o nível de hemoglobina materna no parto (93). A incidência de malária notificada no sistema SIVEP-Malária nos primeiros 12 meses de vida pós-natal foi baixa; mas a partir do segundo ano de vida, a incidência de malária vivax notificada cresceu de forma pronunciada. Por sorologia, identificamos que parte importante das infecções por *P. vivax* nos primeiros dois anos de vida permanece silenciosa para o sistema de saúde brasileiro; essas infecções não são diagnosticadas e tratadas com antimaláricos. No que tange aos fatores associados com infecção por *Plasmodium* no início da vida pós-natal, a exposição à malária na vida intrauterina foi fator associado com aumento de risco de infecção por *P. vivax* nos primeiros dois anos de vida, tanto de infecções clínicas, como de infecções subpatentes ou assintomáticas. Observamos que o aleitamento materno prolongado, por 12 meses ou mais, se associou com proteção contra infecção por *P. vivax* identificada por sorologia, mas não foi fator de proteção contra malária vivax notificada no sistema SIVEP-Malária. O diagnóstico de malária nos primeiros dois anos de vida pós-natal se associou com aumento de risco de anemia aos dois anos de idade; casos de malária recentes ou repetidos tiveram efeito negativo mais pronunciado.

5.1 INFECÇÃO POR *PLASMODIUM* NOS PRIMEIROS DOIS ANOS DA VIDA DE CRIANÇAS DA COORTE MINA-BRASIL

5.1.1 Ocorrência

A prevalência de período de malária notificada no sistema SIVEP-Malária nos primeiros dois anos de vida da população deste estudo foi de 7,1% – 89,0% dos casos foram diagnosticados como malária vivax. Entre as crianças que tiveram malária notificada, episódios repetidos foram comuns: 53,6% tiveram mais de um caso notificado e 19,1% tiveram 4 ou mais episódios notificados. Vimos que a incidência de malária foi baixa ao longo

do primeiro ano de vida e aumentou de forma pronunciada a partir dos 12 meses de idade (Figura 9). As crianças mais expostas foram as que residiam na região rural (Figura 13).

Para identificar infecções por *P. vivax* independentemente de terem sido notificadas no sistema SIVEP-Malária, fizemos sorologia para antígenos da fase sanguínea desse parasito. Dessa forma, localizamos crianças que tiveram infecções subpatentes, assintomáticas ou com sintomas leves, e que não foram diagnosticadas com malária. Vimos que grande parte das infecções por *P. vivax* no início da vida permanece silenciosa ao sistema de saúde brasileiro e, portanto, não recebe tratamento com antimaláricos. Neste estudo, 77,3% das crianças que tiveram ao menos uma infecção por *P. vivax* no primeiro ano de vida – identificada por sorologia ou malária notificada no sistema SIVEP-Malária – não tiveram nenhum caso de malária vivax notificado; nos primeiros dois anos de vida, metade das crianças expostas às fases sanguíneas de *P. vivax* não teve malária vivax notificada (Figura 12).

Não sabemos o impacto, para a saúde infantil, das infecções por *P. vivax* que não foram tratadas com antimaláricos. Tampouco sabemos a duração e frequência – número de infecções não diagnosticadas – dessas infecções na população deste estudo. Porque os primeiros dois anos de vida são um período crucial para o desenvolvimento humano e infecções assintomáticas por *Plasmodium* podem impactar negativamente a saúde do hospedeiro (14,115,121,122), sugerimos que seja considerada a recomendação de busca ativa de infecções por *Plasmodium*, independentemente da presença de sintomas, nas visitas pediátricas de rotina – consultas já recomendadas pelo Ministério da Saúde: primeira semana de vida, 1 mês, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses e 24 meses (123). A inclusão de busca ativa de infecções por *Plasmodium* nas consultas de rotina ao longo da primeira infância, além de possibilitar o tratamento de infecções assintomáticas, pode identificar reservatórios de malária invisíveis ao sistema de saúde brasileiro (118), contribuindo, assim, para o controle da transmissão de malária no país – o Brasil tem a meta de eliminar a transmissão de malária até 2035 (124).

5.1.2 Fatores associados

5.1.2.1 Exposição à malária na vida intrauterina

A exposição à malária na vida intrauterina foi fator associado com aumento de risco de infecção por *P. vivax* no início da vida pós-natal – tanto com infecções notificadas, como com infecções identificadas por sorologia (Tabelas 4 e 7). Entendemos que essa associação possui fragilidades: certamente, crianças expostas à malária na vida intrauterina podem ter maior risco de infecção no início da vida em decorrência de fatores ambientais comuns aos vivenciados no período gestacional. Para minimizar o viés das condições ambientais compartilhadas, ajustamos os modelos construídos para investigar os fatores associados com infecção por *Plasmodium* com a variável IPA na região de moradia – um indicador de nível de transmissão de malária na região de moradia durante o período deste estudo.

Estudos realizados no continente africano sugeriram que a exposição a antígenos de *P. falciparum* na vida intrauterina pode provocar fenótipo imunotolerante para malária na infância (37,39). Ainda que *P. vivax* atinja a saúde placentária de maneira menos agressiva que *P. falciparum*, é possível que a associação entre infecção por *P. vivax* na gestação e aumento de risco de malária na infância, observada neste estudo, tenha componente causal. Considerando os resultados deste estudo, consonantes aos de estudos realizados na África com *P. falciparum*, acreditamos que a investigação da imunologia de neonatos que foram expostos à malária vivax na gestação seja assunto interessante a ser investigado, além de relevante para a saúde infantil em regiões endêmicas para *P. vivax*.

5.1.2.2 Aleitamento materno

O aleitamento materno está entrelaçado com a imunidade infantil não só pela presença de anticorpos maternos e compostos bioativos, mas também através da colonização e manutenção de microbiota saudável no intestino da criança amamentada (84–86). A importância da amamentação na prevenção de doenças infecciosas é conhecida – estima-se que a amamentação pode evitar metade dos casos de diarreia e um terço das infecções respiratórias no início da vida (79,80). No campo da malária, sobretudo malária

vivax, a dimensão do papel da amamentação ainda não está clara; mas o aleitamento materno já foi associado com proteção contra malária falciparum (90–92).

Neste estudo, o aleitamento materno prolongado (≥ 12 meses) foi um fator de proteção contra evidência sorológica de ao menos uma infecção prévia por *P. vivax* nos primeiros dois anos de vida – presença de anticorpos para ≥ 2 antígenos investigados (PvDBP, PvAMA1 e PvMSP119) aos 12 ou 24 meses (Tabela 7). Essa foi uma associação robusta que se manteve mesmo quando expandimos nossa definição de “evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax*” como positividade para ≥ 1 antígenos investigados aos 12 ou 24 meses (Tabela 8). Não vimos a mesma associação para o desfecho de ao menos uma ocorrência de malária vivax notificada no sistema SIVEP-Malária nos primeiros dois anos de vida (Tabela 9). É possível que as crianças que tiveram malária vivax notificada tenham sido mais expostas ao parasito do que as crianças que, apesar de infectadas, não tiveram diagnóstico de malária. São necessários mais estudos, com população maior e mais diversa, para que haja melhor entendimento do papel do aleitamento materno na proteção contra malária vivax; participaram dessa parte do estudo apenas crianças residentes na região urbana e periurbana de Cruzeiro do Sul.

5.1.2.3 Baixa incidência de malária vivax no primeiro ano de vida

A incidência de malária vivax notificada no início da vida pós-natal dos participantes da coorte MINA-Brasil foi baixa ao longo do primeiro ano e aumentou significativamente a partir do segundo ano de vida (Figura 9). Identificamos, em extrato da população deste estudo, sobretudo ao longo do primeiro ano de vida, ocorrência de infecções por *P. vivax* que não foram notificadas (Figura 12), o que sugere presença de infecções assintomáticas, com sintomas leves ou subpatentes, em indivíduos que não tiveram tempo de desenvolver imunidade clínica através de exposições repetidas ao parasito. Em alguma medida, as crianças deste estudo estiveram protegidas da malária vivax no início da vida pós-natal.

Muitos fatores podem estar associados com a baixa incidência de malária vivax ao longo do primeiro ano de vida das crianças da coorte MINA-Brasil. (a) Nos primeiros meses de vida, anticorpos IgG maternos e a presença de hemoglobinas fetais podem ter contribuído para proteção contra a malária vivax (58–61). (b) Vimos que o aleitamento materno prolongado foi um fator de proteção para evidência sorológica de infecção por *P.*

vivax ao longo dos primeiros dois anos de vida. É possível que no primeiro ano de vida o aleitamento materno tenha tido papel ainda mais relevante na proteção contra infecção por *P. vivax* e agravamento da doença – aos 6 meses, 83,0% da população da coorte MINA-Brasil era amamentada; aos 12 meses 69,4% ainda recebiam leite materno (96). (c) Os sintomas de malária no início da vida podem ter se confundido com outras condições de saúde, e essa falta de especificidade pode não ter instigado a procura por exame diagnóstico de malária. (d) Aspectos comportamentais podem ter limitado a exposição ao parasito e diminuído a carga parasitária no primeiro ano de vida. Vimos que o aumento de incidência de malária *vivax* coincidiu com o momento em que as crianças começam a dormir menos, a caminhar, e, possivelmente, ficar mais tempo fora de casa. (e) Finalmente, a carga de recaídas tende a ser maior à medida que o tempo passa e mais crianças são expostas ao parasito, o que pode contribuir para o aumento expressivo de casos de malária *vivax* no segundo ano de vida.

Nossos resultados parecem apontar para lado oposto do que foi relatado no Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental, onde a malária *vivax* é uma importante causa de morbidade justamente no início da vida (16,17,23,27). Mas essa diferença possivelmente é decorrente do nível de transmissão de malária, que é maior no Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental. Diferente do que é visto no continente africano, onde o aumento de incidência de malária *falciparum* acontece aproximadamente aos seis meses de idade, ou até antes disso (54–57), neste estudo a proteção contra a malária *vivax* se estendeu pelos primeiros 12 meses de vida.

5.1.3 Anemia

Identificamos na população deste estudo aumento de risco de anemia aos dois anos de idade em crianças que tiveram diagnóstico de malária; episódios repetidos, incluindo de malária *vivax* em específico, aumentaram esse risco ainda mais (Figura 16).

A anemia é uma das principais implicações clínicas da malária *vivax*. Em infecções por *P. vivax*, a perda de hemácias não infectadas é proporcionalmente maior do que em infecções por *P. falciparum* (20). Por essa razão, mesmo com parasitemias relativamente baixas – características de *P. vivax*, espécie que invade somente reticulócitos – a massa de hemácias perdidas na malária *vivax* e na malária *falciparum* é comparável. Soma-se ainda, a ocorrência de episódios repetidos de malária *vivax* a partir de uma única infecção. As

recaídas de malária vivax, que muitas vezes acontecem próximas da infecção primária, podem prolongar e agravar a anemia (7,16,17,20). No Sudeste Asiático, em regiões endêmicas para *P. vivax* e para *P. falciparum*, *P. vivax* foi identificado como o principal responsável por anemia na infância e por anemia grave nos primeiros meses de vida (16,17). Neste estudo, vimos que na Amazônia Brasileira – região de baixa endemicidade para malária quando comparada com o Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental – a malária vivax também está associada com aumento de risco de anemia no início da vida. Identificamos que em um dos principais focos de malária do Brasil, o risco de malária, e da anemia associada à malária, é bastante heterogêneo: ainda que a maior parte das crianças deste estudo tenham passado os primeiros dois anos de vida livres de diagnóstico de malária, as crianças que tiveram ≥ 4 casos diagnosticados nos primeiros dois anos de vida foram responsáveis por $>40\%$ dos casos de malária diagnosticados na população deste estudo.

A infecção prévia por *P. vivax* identificada por sorologia também foi fator associado com aumento de risco de anemia aos dois anos de idade (Figura 17). Quando avaliamos a associação entre evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax* e excluímos da análise as crianças que tiveram também casos de malária vivax notificados no sistema SIVEP-Malária, não identificamos associação entre essa exposição e anemia aos dois anos de idade (Figura 17) – possivelmente porque: (a) participaram dessa análise somente as crianças residentes na região urbana e periurbana de Cruzeiro do Sul (as menos pobres e menos expostas à malária), (b) neste estudo a sensibilidade da sorologia para identificar exposições prévias ao *P. vivax* foi baixa, (c) estimamos a exposição às fases sanguíneas de *P. vivax* com somente dois pontos de amostragem e (d) não avaliamos a duração e o número de infecções não notificadas.

Além da malária, a anemia materna no parto, que na população deste estudo está associada com malária na gestação (93), se associou com aumento de risco de anemia aos dois anos de idade (Tabela 10). Ainda que a relação entre nível de hemoglobina materno durante a gestação e nível de hemoglobina na infância já tenha sido relatada (125), é possível que, neste estudo, essa associação tenha um componente importante de confundidores residuais, uma vez que a malária na gestação também está associada com aumento de risco de infecção por *P. vivax* na vida pós-natal. Na análise com a variável de “evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax*” – que apesar de ter sido feita com um

número menor de participantes, incluiu casos assintomáticos de infecção – a anemia materna no parto não foi fator associado com o risco de anemia na infância (Tabela 12).

Acreditamos que tenhamos detectado o efeito mínimo da malária sobre o nível de hemoglobina nos primeiros dois anos de vida de crianças do Vale do Alto Juruá, e que o impacto seja maior em populações mais vulneráveis da mesma região. Entre as 860 crianças que participaram da visita aos dois anos, 76,6% tiveram o nível de hemoglobina medido também aos 12 meses de idade; 41,0% delas estavam com anemia e receberam suplementação de ferro nesse momento. Todo o recorte populacional que participou da análise de anemia e exposição de “evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax*” (n = 428), teve o nível de hemoglobina medido aos 12 meses de idade; 44,2% dessa população estava com anemia e recebeu suplementação de ferro. Apesar de não ter sido feito acompanhamento e avaliação da adesão à suplementação, é possível que o impacto da malária no risco de anemia aos dois anos tenha sido atenuado nas crianças que receberam suplementação. Além disso, as crianças da região rural, que são as mais vulneráveis à malária, não foram avaliadas para nível de hemoglobina aos dois anos de idade. Caso a população rural e as crianças residentes na região urbana de Cruzeiro do Sul que não foram acompanhadas pela coorte MINA-Brasil (mais pobres quando comparadas com as crianças que foram acompanhadas) tivessem sido incluídas – populações que muitas vezes estão expostas a outros fatores além da malária que podem afetar negativamente a saúde – possivelmente o impacto da malária no nível de hemoglobina teria sido ainda mais grave.

5.2 LIMITAÇÕES

Recuperamos retrospectivamente do sistema SIVEP-Malária os casos de malária notificados ao longo dos primeiros dois anos de vida da população da coorte MINA-Brasil. É possível que não tenhamos recuperado todos os casos diagnosticados. Além disso, a procura por diagnóstico de malária pode estar associada com condições sociais e com a facilidade de acesso aos serviços de saúde, o que agrega viés nos resultados deste estudo.

A sensibilidade e especificidade da sorologia para identificar infecções prévias por *P. vivax* depende da biologia do hospedeiro e de características do antígeno – a combinação e imunogenicidade dos antígenos, longevidade dos anticorpos, duração da infecção e a população estudada (126–128), são fatores determinantes para a efetividade da técnica.

Neste estudo, a idade da população é um importante componente a ser considerado, já que foi relatada menor longevidade de anticorpos gerados por crianças com idade inferior a três anos quando comparada com a longevidade de anticorpos gerados por crianças mais velhas (126). Além disso, vimos que a prevalência de positividade para anticorpos anti-PvAMA1 foi muito baixa nas crianças da coorte MINA-Brasil que participaram da avaliação sorológica (Figura 10), provavelmente porque a resposta humoral para esse antígeno está associada com exposições repetidas ao parasito, não sendo este um bom antígeno para identificar infecções ocorridas em região de relativa baixa endemicidade para malária, e em crianças. Para evitar o risco de falsos positivos, priorizamos a especificidade da sorologia e optamos por uma definição de “evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax*” restritiva. Vimos que 7 crianças tiveram casos de malária notificados no sistema SIVEP-Malária e não se enquadraram no critério de positividade pra evidência sorológica de infecção prévia por *P. vivax*, o que evidencia a baixa sensibilidade da metodologia. Além disso, não identificamos infecções que não levaram a soroconversão, nem o número de infecções prévias não diagnosticadas e a duração dessas infecções. Certamente, neste estudo, revelamos com a sorologia somente uma parcela das infecções por *P. vivax* silenciosas ao sistema de saúde brasileiro.

As crianças que participaram das análises de anemia aos dois anos de idade (n = 860) e da avaliação sorológica (n = 435) não representam a população de nascidos vivos autorizada a participar do estudo MINA-Brasil (n = 1551), ou as crianças elegíveis ao acompanhamento pela coorte MINA-Brasil (n = 1246). Os resultados dessa parte do trabalho devem ser interpretados levando em consideração que o extrato populacional que participou das análises é menos pobre, tem maior acesso aos serviços de saúde e menor exposição à malária, quando comparado com a população não incluída nessas análises (Tabelas 1 e 2). Não foram incluídas as crianças mais vulneráveis à malária, aquelas residentes na região rural de Cruzeiro do Sul.

Não conseguimos investigar a associação entre níveis de anticorpos IgG maternos no parto e o risco de malária vivax subsequente no início da vida pós-natal. A incidência de notificação de malária vivax no primeiro ano de vida dos participantes da coorte MINA-brasil foi baixa, e o tamanho da população deste estudo não foi suficiente para realizar essa investigação.

6 CONCLUSÃO

Identificamos efeito cumulativo da malária vivax nos primeiros 1000 dias de vida de crianças da Amazônia Brasileira. Em estudo anterior, vimos que um único caso de malária vivax diagnosticado na gestação foi suficiente para impactar os desfechos de peso ao nascer e nível de hemoglobina materna no parto, e que episódios repetidos tiveram efeito negativo, para esses desfechos, ainda maior (93). Agora, identificamos que as crianças que foram expostas à malária na vida intrauterina tiveram maior risco de infecção e doença por *P. vivax* nos primeiros dois anos de vida. O diagnóstico recente ou de mais de mais de um caso de malária vivax nos primeiros dois anos da vida pós-natal se associou com aumento de risco de anemia aos dois anos de idade. Entre as crianças que tiveram ao menos uma malária vivax diagnosticada, episódios repetidos de malária vivax foram comuns.

Vimos que parte importante das infecções por *P. vivax* nos primeiros dois anos de vida não é diagnosticada e, portanto, não é tratada com antimaláricos. Identificamos que no Brasil há subnotificação de infecções por *Plasmodium* no início da vida e sugerimos que a busca ativa de infecção por *Plasmodium*, independentemente da presença de sintomas, seja feita nas consultas pediátricas de rotina que já são recomendadas pelo Ministério da Saúde.

O aleitamento materno foi um fator de proteção importante contra infecção por *P. vivax* identificada por sorologia. Os resultados deste estudo reforçam, mais uma vez, a importância da promoção do aleitamento materno e construção de políticas públicas de saúde que possibilitem que as mães amamentem seus filhos até os dois anos de idade (80).

O efeito cumulativo da malária vivax nos primeiros 1000 dias de vida de crianças da Amazônia Brasileira e a presença importante de infecções por *P. vivax* não diagnosticadas apontam para a necessidade de estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento de infecções por *P. vivax*, específicas para gestantes e crianças.

REFERÊNCIAS¹

1. Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(10):701–12.
2. Cowman AF, Tonkin CJ, Tham WH, Duraisingh MT. The molecular basis of erythrocyte invasion by malaria parasites. *Cell Host Microbe*. 2017;22(2):232–45.
3. Weiss DJ, Lucas TCD, Nguyen M, Nandi AK, Bisanzio D, Battle KE, et al. Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of *Plasmodium falciparum*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. *Lancet*. 2019;394(10195):322–31.
4. Price RN, Douglas NM, Anstey NM. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis*. 2009;22(5):430–5.
5. Battle KE, Lucas TCD, Nguyen M, Howes RE, Nandi AK, Twohig KA, et al. Mapping the global endemicity and clinical burden of *Plasmodium vivax*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. *Lancet*. 2019;394(10195):332–43.
6. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(9):555–66.
7. Phyto AP, Dahal P, Mayxay M, Ashley EA. Clinical impact of vivax malaria: A collection review. *PLoS Med*. 2022;19(1):e1003890.
8. Ferreira MU, Castro MC. Malaria situation in Latin America and the Caribbean: residual and resurgent transmission and challenges for control and elimination. *Methods Mol Biol*. 2019;2013:57-70.
9. Douglas NM, Burkot TR, Price RN. Malaria eradication revisited. *Int J Epidemiol*. 2022;51(2):382–92.
10. Marchesini P, Carter R, Mendis K, Sina B. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;64(1-2 Suppl):97–106.
11. Ashley EA, Poespoprodjo JR. Treatment and prevention of malaria in children. *Lancet Child Adolesc Health*. 2020;4(10):775–89.

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

12. Paton RS, Kamau A, Akech S, Agweyu A, Ogero M, Mwandawiro C, et al. Malaria infection and severe disease risks in Africa. *Science*. 2021;373(6557):926–31.
13. Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol*. 2013; 81:77–131.
14. Ferreira MU, Ladeia-Andrade S, Coura JR, Curado I, de Carvalho ME. 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.
15. Patriani D, Arguni E, Kenangalem E, Dini S, Sugiarto P, Hasanuddin A, et al. Early and late mortality after malaria in young children in Papua, Indonesia. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):922.
16. Kenangalem E, Karyana M, Burdarm L, Yeung S, Simpson JA, Tjitra E, et al. *Plasmodium vivax* infection: a major determinant of severe anaemia in infancy. *Malar J*. 2016;15:321.
17. Douglas NM, Lampah DA, Kenangalem E, Simpson JA, Poespoprodjo JR, Sugiarto P, et al. Major burden of severe anemia from non-falciparum malaria species in Southern Papua: a hospital-based surveillance study. *PLoS Med*. 2013;10(12):e1001575.
18. White NJ. Anaemia and malaria. *Malar J*. 2018;17(1):371.
19. Rivera-Correa J, Rodriguez A. Autoimmune anemia in malaria. *Trends Parasitol*. 2020;36(2):91–7.
20. Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, et al. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2012;11:135.
21. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today*. 2000;16(11):469–76.
22. Perin J, Mulick A, Yeung D, Villavicencio F, Lopez G, Strong KL, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–19: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet Child Adolesc Health*. 2022;6(2):106–15.
23. Douglas NM, Kenangalem E, Hasanuddin A, Anstey NM, Sugiarto P, Price RN, et al. Malaria-related hospitalization during childhood in Papua, Indonesia: a retrospective cohort study. *PLoS One*. 2020;15(1):e0228018.
24. Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Hasanuddin A, Warikar N, et al. Vivax malaria: a major cause of morbidity in early infancy. *Clin Infect Dis*. 2009;48(12):1704–12.

25. Lin E, Kiniboro B, Gray L, Dobbie S, Robinson L, Laumaea A, et al. Differential patterns of infection and disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in young papua new guinean children. PLoS One. 2010;5(2):e9047.
26. Phimpraphi W, Paul RE, Yimsamran S, Puangsa-art S, Thanyavanich N, Maneeboonyang W, et al. Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in a Karen population in Thailand. Malar J. 2008;7(1):99.
27. Karyana M, Burdarm L, Yeung S, Kenangalem E, Wariker N, Maristela R, et al. Malaria morbidity in Papua Indonesia, an area with multidrug resistant *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. Malar J. 2008;7(1):148.
28. World Health Organization. World malaria report 2021. Geneva; 2021. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/350147>
29. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. Lancet Infect Dis. 2007;7(2):93–104.
30. Saito M, Briand V, Min AM, McGready R. Deleterious effects of malaria in pregnancy on the developing fetus: a review on prevention and treatment with antimalarial drugs. Lancet Child Adolesc Health. 2020;4(10):761–74.
31. Luxemburger C. Effects of malaria during pregnancy on infant mortality in an area of low malaria transmission. Am J Epidemiol. 2001;154(5):459–65.
32. Ma R, Lian T, Huang R, Renn JP, Petersen JD, Zimmerberg J, et al. Structural basis for placental malaria mediated by *Plasmodium falciparum* VAR2CSA. Nat Microbiol. 2021;6(3):380–91.
33. Fried M, Duffy PE. Malaria during pregnancy. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7(6):a025551.
34. Dechavanne S, Srivastava A, Gangnard S, Nunes-Silva S, Dechavanne C, Fievet N, et al. Parity-dependent recognition of DBL1X-3X suggests an important role of the VAR2CSA high-affinity CSA-binding region in the development of the humoral response against placental malaria. Infect Immun. 2015;83(6):2466–74.
35. Doritchamou J, Teo A, Morrison R, Arora G, Kwan J, Manzella-Lapeira J, et al. Functional antibodies against placental malaria parasites are variant dependent and differ by geographic region. Infect Immun. 2019;87(7):e00865-18.
36. Fowkes FJI, McGready R, Cross NJ, Hommel M, Simpson JA, Elliott SR, et al. New insights into acquisition, boosting, and longevity of immunity to malaria in pregnant women. J Infect Dis. 2012;206(10):1612–21.

37. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Wamachi A, Ouma JH, Narum DL, et al. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype?: a prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med.* 2009;6(7):e1000116.
38. Dechavanne C, Nouatin O, Adamou R, Edslev S, Hansen A, Meurisse F, et al. Placental malaria is associated with higher LILRB2 expression in monocyte subsets and lower anti-malarial IgG antibodies during infancy. *Front Immunol.* 2022;13:909831.
39. Boudová S, Divala T, Mungwira R, Mawindo P, Tomoka T, Laufer MK. Placental but not peripheral *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy is associated with increased risk of malaria in infancy. *J Infect Dis.* 2017;216(6):732–5.
40. Mutabingwa TK, Bolla MC, Li JL, Domingo GJ, Li X, Fried M, et al. Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. *PLoS Med.* 2005;2(12):e407.
41. Schwarz NG, Adegnika AA, Breitling LP, Gabor J, Agnandji ST, Newman RD, et al. Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life. *Clin Infect Dis.* 2008;47(8):1017–25.
42. Andronescu LR, Sharma A, Peterson I, Kachingwe M, Kachepa W, Liang Y, et al. The effect of Intermittent Preventive Treatment of malaria during pregnancy and placental malaria on infant risk of malaria. *J Infect Dis.* 2021;225(2):248–56.
43. Dent A, Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Crabb BS, Kazura JW, et al. Prenatal malaria immune experience affects acquisition of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-1 invasion inhibitory antibodies during infancy. *J Immunol.* 2006;177(10):7139–45.
44. Bonner PC, Zhou Z, Mirel LB, Ayisi JG, Shi YP, van Eijk AM, et al. Placental malaria diminishes development of antibody responses to *Plasmodium falciparum* epitopes in infants residing in an area of Western Kenya where *P. falciparum* is Endemic. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(3):375–9.
45. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med.* 1995;182(2):409-18.
46. Chua CLL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol.* 2013;29(1):26–34.
47. Souza RM, Ataíde R, Dombrowski JG, Ippólito V, Aitken EH, Valle SN, et al. Placental histopathological changes associated with *Plasmodium vivax* infection during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(2):e2071.

48. Machado Filho AC, Paim BV, da Costa EP, da Costa EP, Fernandes EAC, Reis IS, et al. Effects of vivax malaria acquired before 20 weeks of pregnancy on subsequent changes in fetal growth. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(2):371–6.
49. Ataíde R, Murillo O, Dombrowski JG, Souza RM, Lima FA, Lima GFMC, et al. Malaria in pregnancy interacts with and alters the angiogenic profiles of the placenta. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(6):e0003824.
50. Falade C, Mokuolu O, Okafor H, Orogade A, Falade A, Adedoyin O, et al. Epidemiology of congenital malaria in Nigeria: a multi-centre study. *Trop Med Int Health.* 2007;12(11):1279–87.
51. Bardají A, Martínez-Espinosa FE, Arévalo-Herrera M, Padilla N, Kochar S, Ome-Kaius M, et al. Burden and impact of *Plasmodium vivax* in pregnancy: a multi-centre prospective observational study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(6):e0005606.
52. Cardona-Arias JA, Carmona-Fonseca J. Congenital malaria: frequency and epidemiology in Colombia, 2009-2020. *PLoS One.* 2022;17(2):e0263451.
53. Snow RW, Nahlen B, Palmer A, Donnelly CA, Gupta S, Marsh K. Risk of severe malaria among african Infants: direct evidence of clinical protection during early infancy. *J Infect Dis.* 1998;177(3):819–22.
54. Riley E, McGuinness D, Bennett S, Nkrumah F, Wagner G, Koram K. High incidence of asymptomatic malara infections in a birth cohort of children less than one year of age in Ghana, detected by multicopy gene polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(1):115–23.
55. Kitua AY, Smith T, Alonso PL, Masanja H, Urassa H, Menendez C, et al. *Plasmodium falciparum* malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health.* 1996;1(4):475–84.
56. Natama HM, Rovira-Vallbona E, Somé MA, Zango SH, Sorgho H, Guetens P, et al. Malaria incidence and prevalence during the first year of life in Nanoro, Burkina Faso: a birth-cohort study. *Malar J.* 2018;17(1):163.
57. Gonçalves BP, Huang CY, Morrison R, Holte S, Kabyemela E, Prevots DR, et al. Parasite burden and severity of malaria in tanzanian children. *N Engl J Med.* 2014;370(19):1799–808.
58. Amaratunga C, Lopera-Mesa TM, Brittain NJ, Cholera R, Arie T, Fujioka H, et al. A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to *Plasmodium falciparum* Malaria. *PLoS One.* 2011;6(4):e14798.
59. Billig EM, McQueen PG, McKenzie FE. Foetal haemoglobin and the dynamics of paediatric malaria. *Malar J.* 2012;11(1):396.

60. Dobbs KR, Dent AE. *Plasmodium* malaria and antimalarial antibodies in the first year of life. *Parasitology*. 2016;143(2):129–38.
61. Riley EM, Wagner GE, Akanmori BD, Koram KA. Do maternally acquired antibodies protect infants from malaria infection? *Parasite Immunol*. 2001;23(2):51–9.
62. Deloron P, Dubois' B, Hesran L, Cot M. Isotypic analysis of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Cameroon, and relationship with risk of *P. falciparum* infection. *Clin Exp Immunol*. 1997;110(2):212–8.
63. Khattab A, Chia YS, May J, Le Hesran JY, Deloron P, Klinkert MQ. The impact of IgG antibodies to recombinant *Plasmodium falciparum* 732var CIDR-1 α domain in mothers and their newborn babies. *Parasitol Res*. 2007;101(3):767–74.
64. Kangoye DT, Nebie I, Yaro JB, Debe S, Traore S, Ouedraogo O, et al. *Plasmodium falciparum* malaria in children aged 0-2 years: the role of foetal haemoglobin and maternal antibodies to two asexual malaria vaccine candidates (MSP3 and GLURP). *PLoS One*. 2014;9(9):e107965.
65. Riley EM, Wagner GE, Ofori MF, Wheeler JG, Akanmori BD, Tetteh K, et al. Lack of association between maternal antibody and protection of african infants from malaria infection. *Infect Immun*. 2000;68(10):5856–63.
66. Simister N. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*. 2003;21(24):3365–9.
67. Lozano NA, Lozano A, Marini V, Saranz RJ, Blumberg RS, Baker K, et al. Expression of FcRn receptor in placental tissue and its relationship with IgG levels in term and pre-term newborns. *Am J Reprod Immunol*. 2018;80(3):e12972.
68. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):715–25.
69. Msallam R, Balla J, Rathore APS, Kared H, Malleret B, Saron WAA, et al. Fetal mast cells mediate postnatal allergic responses dependent on maternal IgE. *Science*. 2020;370(6519):941–50.
70. Brinkhaus M, van der Kooi EJ, Bentlage AEH, Ooijevaar-de Heer P, Derksen NIL, Rispens T, et al. Human IgE does not bind to human FcRn. *Sci Rep*. 2022;12(1):62.
71. Charnaud SC, McGready R, Herten-Crabb A, Powell R, Guy A, Langer C, et al. Maternal-foetal transfer of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* antibodies in a low transmission setting. *Sci Rep*. 2016;6(1):20859.
72. Cumberland P, Shulman CE, Maple PAC, Bulmer JN, Dorman EK, Kawuondo K, et al. Maternal HIV infection and placental malaria reduce transplacental antibody transfer and tetanus antibody levels in newborns in Kenya. *J Infect Dis*. 2007;196(4):550–7.

73. McKittrick ND, Vu DM, Malhotra I, King CH, Mutuku F, LaBeaud AD. Parasitic infections in pregnancy decrease placental transfer of antipneumococcus antibodies. *Clin Vaccine Immunol.* 2017; 24(6):e00039-17.
74. Okoko BJ, Wesumperuma LH, Ota MOC, Pinder M, Banya W, Gomez SF, et al. The influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinemia on transplacental transfer of antibodies and IgG subclasses in a rural West African Population. *J Infect Dis.* 2001;184(5):627–32.
75. Moore KA, Simpson JA, Wiladphaingern J, Min AM, Pimanpanarak M, Paw MK, et al. Influence of the number and timing of malaria episodes during pregnancy on prematurity and small-for-gestational-age in an area of low transmission. *BMC Med.* 2017;15:117.
76. Pou C, Nkulikiyimfura D, Henckel E, Olin A, Lakshmikanth T, Mikes J, et al. The repertoire of maternal anti-viral antibodies in human newborns. *Nat Med.* 2019;25(4):591–6.
77. Jennewein MF, Abu-Raya B, Jiang Y, Alter G, Marchant A. Transfer of maternal immunity and programming of the newborn immune system. *Semin Immunopathol.* 2017;39(6):605–13.
78. Kling PJ, Schmidt RL, Roberts RA, Widness JA. Serum erythropoietin levels during infancy: associations with erythropoiesis. *J Pediatr.* 1996;128(6):791–6.
79. Victora CG. Infection and disease: the impact of early weaning. *Food Nutr Bull.* 1996;17(4):1–8.
80. Victora CG, Bahl R, Barros AJD, França GVA, Horton S, Krasevec J, et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *The Lancet.* 2016;387(10017):475–90.
81. Sankar MJ, Sinha B, Chowdhury R, Bhandari N, Taneja S, Martinez J, et al. Optimal breastfeeding practices and infant and child mortality: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* 2015;104:3–13.
82. Chowdhury R, Sinha B, Sankar MJ, Taneja S, Bhandari N, Rollins N, et al. Breastfeeding and maternal health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* 2015;104:96–113.
83. Atyeo C, Alter G. The multifaceted roles of breast milk antibodies. *Cell.* 2021;184(6):1486–1499.
84. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: a review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev.* 2015;91(11):629–35.

85. Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang S, Rollie A, et al. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatr.* 2017;171(7):647.
86. Le Doare K, Holder B, Bassett A, Pannaraj PS. Mother's milk: a Purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. *Front Immunol.* 2018;9:361.
87. Mukherjee D, Chora ÂF, Mota MM. Microbiota, a third player in the host-*Plasmodium* affair. *Trends Parasitol.* 2020;36(1):11–8.
88. van den Elsen LWJ, Kollmann TR, Verhasselt V. Microbial antigen in human milk: a natural vaccine? *Mucosal Immunol.* 2022; 15(6):1058-1059.
89. van den Elsen LWJ, Verhasselt V, Egwang T. Malaria antigen shedding in the breast milk of mothers from a region with endemic malaria. *JAMA Pediatr.* 2020;174(3):297.
90. Brazeau NF, Tabala M, Kiketa L, Kayembe D, Chalachala JL, Kawende B, et al. Exclusive breastfeeding and clinical malaria risk in 6-month-old infants: a cross-sectional study from Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(4):827–30.
91. Vora N, Homsy J, Kakuru A, Arinaitwe E, Wanzira H, Sandison TG, et al. Breastfeeding and the risk of malaria in children born to HIV-Infected and uninfected mothers in rural Uganda. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;55(2):253–61.
92. Safeukui-Noubissi I, Ranque S, Poudiougou B, Keita M, Traoré A, Traoré D, et al. Risk factors for severe malaria in Bamako, Mali: a matched case-control study. *Microbes Infect.* 2004;6(6):572–8.
93. Pincelli A, Neves PAR, Lourenço BH, Corder RM, Malta MB, Sampaio-Silva J, et al. The hidden burden of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy in the Amazon: an observational study in Northwestern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99(1):73–83.
94. Pincelli A. Malária na gestação na Amazônia Ocidental Brasileira: fatores associados e implicações para a saúde materno-fetal. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.
95. Christian P, Murray-Kolb LE, Tielsch JM, Katz J, LeClerq SC, Khatry SK. Associations between preterm birth, small-for-gestational age, and neonatal morbidity and cognitive function among school-age children in Nepal. *BMC Pediatr.* 2014;14(1):58.
96. Cardoso MA, Matijasevich A, Malta MB, Lourenco BH, Gimeno SGA, Ferreira MU, et al. Cohort profile: the Maternal and Child Health and Nutrition in Acre, Brazil, birth cohort study (MINA-Brazil). *BMJ Open.* 2020;10(2):e034513.

97. Fontoura PS, Silva MF, da Costa AS, Ribeiro FS, Ferreira MS, Ladeia-Andrade S, et al. Monthly biological larviciding associated with a tenfold decrease in larval density in fish farming ponds and reduced community-wide malaria incidence in Northwestern Brazil. *Parasit Vectors*. 2021;14(1):445.
98. Mosquera PS, Lourenço BH, Gimeno SGA, Malta MB, Castro MC, Cardoso MA, et al. Factors affecting exclusive breastfeeding in the first month of life among Amazonian children. *PLoS One*. 2019;14(7):e0219801.
99. Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento de malária no Brasil - 2ª edição. Brasília; 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/malaria/guia_tratamento_malaria_2nov21_isbn_site.pdf/view
100. Luz TCB, Suárez-Mutis MC, Miranda ES, Moritz AFE, Freitas LF, Brasil J de C, et al. Uncomplicated malaria among pregnant women in the Brazilian Amazon: local barriers to prompt and effective case management. *Acta Trop*. 2013;125(2):137–42.
101. Corder RM, de Lima ACP, Khoury DS, Docken SS, Davenport MP, Ferreira MU. Quantifying and preventing *Plasmodium vivax* recurrences in primaquine-untreated pregnant women: an observational and modeling study in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(7):e0008526.
102. Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento de malária no Brasil. Brasília; 2010. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_tratamento_malaria_brasil.pdf
103. Vicentin EC, Françoso KS, Rocha MV, Iourtov D, dos Santos FL, Kubrusly FS, et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen-1 Expressed in *Pichia pastoris* yeast. *Infect Immun*. 2014;82(3):1296–307.
104. Grimberg BT, Udomsangpetch R, Xainli J, McHenry A, Panichakul T, Sattabongkot J, et al. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy Binding Protein. *PLoS Med*. 2007;4(12):e337.
105. Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP119 expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine*. 2001;20(3–4):385–96.
106. França CT, White MT, He WQ, Hostetler JB, Brewster J, Frato G, et al. Identification of highly-protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. *eLife*. 2017;6:e28673.
107. Barbosa S, Gozze AB, Lima NF, Batista CL, Bastos M da S, Nicolete VC, et al. Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* malaria: a case study in Rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(8):e3109.

108. Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC, Olinto MT. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *Int J Epidemiol.* 1997;26(1):224–7.
109. Lourenço BH, Lima DL, Vivanco E, de Brito Fernandes R, Duarte M, Ribeiro Neves PA, et al. Agreement between antenatal gestational age by ultrasound and clinical records at birth: a prospective cohort in the Brazilian Amazon. *PloS One.* 2020;15(7):e0236055.
110. Sherbourne CD, Stewart AL. The MOS social support survey. *Soc Sci Med.* 1991;32(6):705–14.
111. Barros AJD, Hirakata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol.* 2003;3:21.
112. Pincelli A, Cardoso MA, Malta MB, Johansen IC, Corder RM, Nicolete VC, et al. Low-level *Plasmodium vivax* exposure, maternal antibodies, and anemia in early childhood: population-based birth cohort study in Amazonian Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(7):e0009568.
113. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LHP, 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.
114. Almeida ACG, Kuehn A, Castro AJM, Vitor-Silva S, Figueiredo EFG, Brasil LW, et al. High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors.* 2018;11:194.
115. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, et al. “Asymptomatic” malaria: a chronic and debilitating infection that should be treated. *PLoS Med.* 2016;13(1):e1001942.
116. Pava Z, Burdam FH, Handayuni I, Trianty L, Utami RAS, Tirta YK, et al. Submicroscopic and asymptomatic *Plasmodium* parasitaemia associated with significant risk of anaemia in Papua, Indonesia. *PLoS One.* 2016;11(10): e0165340.
117. Almeida GG, Costa PAC, Araujo M da S, Gomes GR, Carvalho AF, Figueiredo MM, et al. Asymptomatic *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: submicroscopic parasitemic blood infects *Nyssorhynchus darlingi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(10):e0009077.
118. Koepfli C, Nguitragool W, de Almeida ACG, Kuehn A, Waltmann A, Kattenberg E, et al. Identification of the asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocyte reservoir under different transmission intensities. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(8):e0009672.

119. Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MCS, Cunha MG, Yazdani SS, Chitnis CE, et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(3):335–40.
120. Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Hasanuddin A, Warikar N, et al. Vivax malaria: a major cause of morbidity in early infancy. Clin Infect Dis. 2009;48(12):1704–12.
121. McGready R, Lee S, Wiladphaingern J, Ashley E, Rijken M, Boel M, et al. Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: a population-based study. Lancet Infect Dis. 2012;12(5):388–96.
122. Nankabirwa J, Wandera B, Kiwanuka N, Staedke SG, Kamya MR, Brooker SJ. Asymptomatic *Plasmodium* infection and cognition among primary schoolchildren in a high malaria transmission setting in Uganda. Am J Trop Med Hyg. 2013;88(6):1102–8.
123. Ministério da Saúde. Caderneta da criança. Brasília; 2020. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderneta_crianca_menino_2ed.pdf
124. Ministério da Saúde. Elimina malária Brasil - Plano nacional de eliminação da malária. Brasília; 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/malaria/elimina-malaria-brasil-plano-nacional-de-eliminacao-da-malaria>
125. Zhang Y, Jin L, Liu J meng, Ye R, Ren A. Maternal hemoglobin concentration during gestation and risk of anemia in infancy: secondary analysis of a randomized controlled trial. J Pediatr. 2016;175:106–110.e2.
126. Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KKA, Dunyo S, Lanar DE, Pinder M, et al. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. Infect Immun. 2008;76(4):1748–55.
127. Longley RJ, White MT, Takashima E, Brewster J, Morita M, Harbers M, et al. Development and validation of serological markers for detecting recent *Plasmodium vivax* infection. Nat Med. 2020;26(5):741–9.
128. Tayipto Y, Liu Z, Mueller I, Longley RJ. Serology for *Plasmodium vivax* surveillance: A novel approach to accelerate towards elimination. Parasitol Int. 2022;87:102492.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública
 Departamento de Nutrição
 Av. Dr. Arnaldo 715, CEP 01246-904, São Paulo/SP
 Telefone: (11) 3061-7705



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA

**Saúde e Nutrição Materno-Infantil em Cruzeiro do Sul, Acre:
 Estudo Longitudinal de Base Populacional**

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Marly Augusto Cardoso

OBJETIVOS E PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Este estudo tem por objetivo principal **estudar os fatores que influenciam a saúde e a nutrição de crianças de Cruzeiro do Sul desde o início de suas vidas, ainda no período da gestação**. Com as mudanças que observamos nas condições de saúde da nossa população, estudos com essa finalidade são importantes para identificar como prevenir o quanto antes a ocorrência de doenças e infecções, assim como o risco para deficiências nutricionais e distúrbios metabólicos, tanto em gestantes como em seus bebês.

Para isso, nosso estudo inclui três fases:

- 1 Primeiro, nossa equipe de pesquisa, em parceria com agentes de saúde, realizará visitas domiciliares no município para **identificar todas as gestantes com idade gestacional de até 20 semanas**. Essas gestantes serão convidadas a participar do estudo e a responder um questionário inicial sobre a data de sua última menstruação e seus **dados socioeconômicos, demográficos e obstétricos**.
- 2 Segundo, serão agendadas duas **avaliações clínicas, entre 16-20ª semanas e entre 24-28ª semanas de gestação**, no Posto de Saúde do Agricultor. Em cada avaliação, nossa equipe de pesquisa realizará **exame de ultrassonografia** do bebê, medidas de **peso e altura** e coleta de **amostra de sangue venoso** (cerca de 12 mL) da gestante.
O exame de ultrassom será importante para acompanhar o crescimento e o desenvolvimento do bebê no útero da mãe. A amostra de sangue será colhida em jejum de oito horas para realizar hemograma completo, avaliar a presença de anemia, dosar vitaminas A, D e ácido fólico, glicose, insulina e detectar infecção por malária.
- 3 Terceiro, no momento do parto no Hospital da Mulher e da Criança do Juruá, nossa equipe registrará o **tipo de parto, idade gestacional, sexo, peso e comprimento do bebê**. Após o nascimento, será necessário colher uma **amostra de sangue do cordão umbilical** (cerca de 12 mL) e de uma **gota de sangue da placenta**. Também serão coletadas informações sobre possíveis problemas que ocorreram na gestação e sobre qualquer dificuldade que a gestante tenha apresentado para enxergar claramente no período.
A coleta de amostras de sangue do cordão umbilical e da placenta ocorrerá após o parto; portanto, não será dolorosa nem para a mãe e nem para seu bebê. Esse material será muito importante para dosar vitaminas e minerais, avaliar características genéticas e presença de malária no bebê recém-nascido.

BENEFÍCIOS E RISCOS EM PARTICIPAR DA PESQUISA



Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública
Departamento de Nutrição
Av. Dr. Arnaldo 715, CEP 01246-904, São Paulo/SP
Telefone: (11) 3061-7705



Ao participar da pesquisa, a gestante e seu bebê terão avaliação nutricional gratuita por equipe especializada, com **acesso aos resultados de exames individuais**, que ficarão arquivados no seu prontuário do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá e/ou nos postos de saúde.

O desconforto esperado com a participação neste estudo refere-se apenas à coleta de sangue venoso que utilizará profissionais treinados e material descartável. Por isso, os riscos são mínimos e comparáveis a qualquer outra coleta de sangue em laboratórios de análises clínicas.

GARANTIAS, ESCLARECIMENTOS E RECUSA EM PARTICIPAR

Você poderá tirar dúvidas e será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto necessário. **Você é livre para se recusar a participar.** Depois de aceitar participar, você também pode retirar o seu consentimento e **interromper sua participação a qualquer momento, sem nenhum prejuízo** em seu atendimento nos postos de saúde de Cruzeiro do Sul e no Hospital da Mulher e da Criança do Juruá.

Sua participação é voluntária, totalmente confidencial e não acarretará qualquer custo para você. Quando os dados coletados forem utilizados pela equipe de pesquisa neste estudo, os nomes dos participantes nunca serão revelados. Os dados ou o material biológico obtidos neste estudo poderão ser utilizados em outros projetos, com a devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO PÓS-INFORMAÇÃO

E _____, u _____,

, portadora da identidade _____, nascida em ____/____/_____, fui informada de maneira clara e detalhada sobre os objetivos da pesquisa “Saúde e Nutrição Materno-Infantil em Cruzeiro do Sul, Acre: Estudo Longitudinal de Base Populacional”. Após ler e receber explicações sobre a pesquisa, e ter meus direitos de:

1. Receber resposta a qualquer pergunta e esclarecimento sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados à pesquisa;
2. Retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;
3. Não ser identificada e ser mantido o caráter confidencial das informações relacionadas à privacidade;

Declaro que concordo em participar desse estudo, que recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido, e que me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Cruzeiro do Sul, ____/____/____.

Profa. Dra. Marly Augusto Cardoso

Assinatura da participante ou
Impressão do polegar direito

Pesquisador de campo: _____

Telephone: (68)

ANEXO – Artigos publicados durante o doutorado

Artigo 1: *Low-level Plasmodium vivax exposure, maternal antibodies, and anemia in early childhood: Population-based birth cohort study in Amazonian Brazil*

Artigo 2: *Prolonged breastfeeding and the risk of Plasmodium vivax infection and clinical malaria in early childhood*

RESEARCH ARTICLE

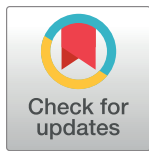
Low-level *Plasmodium vivax* exposure, maternal antibodies, and anemia in early childhood: Population-based birth cohort study in Amazonian Brazil

Anaclara Pincelli¹, Marly A. Cardoso², Máira B. Malta^{2,3}, Igor C. Johansen¹, Rodrigo M. Corder¹, Vanessa C. Nicolete¹, Irene S. Soares⁴, Marcia C. Castro⁵, Marcelo U. Ferreira^{1*}, on behalf of the MINA-Brazil Study Working Group[¶]

1 Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Graduate Program in Collective Health, Catholic University of Santos, Santos, Brazil, **4** Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **5** Department of Global Health and Population, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, Massachusetts, United States of America

¶ A full list of members of the MINA-Brazil Study Working Group is provided in the Acknowledgments section.

* muferrei@usp.br



OPEN ACCESS

Citation: Pincelli A, Cardoso MA, Malta MB, Johansen IC, Corder RM, Nicolete VC, et al. (2021) Low-level *Plasmodium vivax* exposure, maternal antibodies, and anemia in early childhood: Population-based birth cohort study in Amazonian Brazil. PLoS Negl Trop Dis 15(7): e0009568. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568>

Editor: Kamala Thriemer, Menzies School of Health Research, AUSTRALIA

Received: March 20, 2021

Accepted: June 16, 2021

Published: July 15, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568>

Copyright: © 2021 Pincelli et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and the original, anonymized database has been deposited in the WorldWide

Abstract

Background

Malaria causes significant morbidity and mortality in children under 5 years of age in sub-Saharan Africa and the Asia-Pacific region. Neonates and young infants remain relatively protected from clinical disease and the transplacental transfer of maternal antibodies is hypothesized as one of the protective factors. The adverse health effects of *Plasmodium vivax* malaria in early childhood—traditionally viewed as a benign infection—remain largely neglected in relatively low-endemicity settings across the Amazon.

Methodology/Principal findings

Overall, 1,539 children participating in a birth cohort study in the main transmission hotspot of Amazonian Brazil had a questionnaire administered, and blood sampled at the two-year follow-up visit. Only 7.1% of them experienced malaria confirmed by microscopy during their first 2 years of life—89.1% of the infections were caused by *P. vivax*. Young infants appear to be little exposed to, or largely protected from infection, but children >12 months of age become as vulnerable to vivax malaria as their mothers. Few (1.4%) children experienced ≥4 infections during the 2-year follow-up, accounting for 43.4% of the overall malaria burden among study participants. Antenatal malaria diagnosed by microscopy during pregnancy or by PCR at delivery emerged as a significant correlate of subsequent risk of *P. vivax* infection in the offspring (incidence rate ratio, 2.58; $P = 0.002$), after adjusting for local transmission intensity. Anti-*P. vivax* antibodies measured at delivery do not protect mothers from subsequent malaria; whether maternal antibodies transferred to the fetus reduce early malaria risk in children remains undetermined. Finally, recent and repeated vivax malaria episodes in

Antimalarial Resistance Network (WWARN) Data Platform, hosted by the University of Oxford, as part of the Impact of Malaria in Pregnancy on Infants Study Group. The Terms of Use of these data can be found at www.wwarn.org.

Investigators must direct their data access requests through the WWARN Data Access Committee (DAC), the membership and details of which can be seen at www.wwarn.org/DAC.

Funding: Supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; www.cnpq.br), Brazil (grant 407255/2013-3 to M.A.C.); the Maria Cecília Souto Vidigal Foundation (<https://www.fmcsv.org.br/en-US/>; grant to M.C.C.), Brazil; and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; www.fapesp.br), Brazil (grant 2016/00270-6 to M.A.C.). A.P. (2018/18557-5), M.B.M. (2017/05019-2), and V.C.N. (2020/07020-0) are or were supported by FAPESP scholarships; M.A.C., R.M.C., M.C.C., I.S.S., and M.U.F. receive or received CNPq scholarships. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

early childhood are associated with increased risk of anemia at the age of 2 years in this relatively low-endemicity setting.

Conclusions/Significance

Antenatal infection increases the risk of vivax malaria in the offspring and repeated childhood *P. vivax* infections are associated with anemia at the age of 2 years.

Author summary

Plasmodium vivax malaria causes frequent hospital admissions of infants and toddlers in areas of intense transmission in the Asia-Pacific region, often due to severe anemia, but its epidemiology and burden have been understudied in children from other endemic settings. Here we characterize the cumulative impact of *P. vivax* infections in infants and toddlers exposed to relatively low levels of malaria transmission in the Brazilian Amazon. We have previously shown that vivax malaria in pregnancy is associated with increased risk of maternal anemia and impaired fetal growth in this population. Now we show that the adverse effects of malaria extend to early childhood. Children born to mothers who had one or more infections during pregnancy are at an elevated risk of *P. vivax* malaria in their early life, although the transfer of maternal antibodies to the fetus may provide some short-term protection. Children who are repeatedly infected with *P. vivax* since birth are more likely to be anemic at the age of 2 years. These findings further challenge the traditional view of vivax malaria as a relatively benign infection in pregnancy and early childhood in the Amazon.

Introduction

Malaria transmission has decreased substantially in Latin America and the Caribbean over the past two decades, but 120 million people remain exposed to some risk of infection across this region [1]. *Plasmodium vivax* accounts for 72% of the 889,000 malaria infections reported yearly in the Americas [2] and appears to be more resilient than *P. falciparum* to current control and elimination strategies worldwide mostly due to relapses and early circulation of mosquito-infective blood stages, the gametocytes [3].

P. falciparum infection is a leading cause of morbidity and mortality in children exposed to intense transmission in sub-Saharan Africa [4], but neonates and young infants are relatively protected from clinical disease. The poorly understood protective mechanisms appear to comprise maternal antibodies transferred to the fetus in the last trimester of pregnancy, the relative inability of fetal hemoglobin to support intraerythrocytic parasite development, the deficiency of *p*-aminobenzoic acid in exclusively breastfed infants, and the reduced exposure of young children to mosquito vectors [5]. Infants >6 months of age become gradually vulnerable to repeated infections and children until the age of five years are heavily affected by severe malaria. Partial immunity develops over years and protects most adolescents and adults from clinical disease [6,7].

P. vivax is the second most prevalent human malaria parasite worldwide [2]. It is mostly absent from Central and West Africa, but causes significant morbidity in children elsewhere in the tropics [8–10]. More malaria-related hospital admissions in infants and toddlers are due to *P. vivax* than *P. falciparum* in the Asia-Pacific region, where both species are co-transmitted

[11,12]. Severe anemia is particularly common in young children with malaria, regardless of the infecting parasite species [12,13].

The adverse health effects of vivax malaria in the course of the first 1000 days—from conception to child's second birthday—remain understudied in the Americas [14]. A critical knowledge gap refers to the association between maternal malaria in pregnancy and risk of subsequent *P. vivax* infection in the offspring. No population-based data are available for Brazil, a country that contributes 20% of malaria cases in Latin America and the Caribbean region [2]. Here we examine the burden of early life malaria in Juruá Valley, an Amazonian hotspot in northwestern Brazil that contributes nearly 18% of the country's malaria cases [15]. We describe the incidence of *P. vivax* infection during the first two years of life in a prospective birth cohort study and its association with maternal antibodies and anemia at the age of two years.

Materials and methods

Ethics statement

All mothers or their parents or guardians, if mothers were <18 years old, provided written informed consent. The study protocol was approved by the institutional review board of the School of Public Health, University of São Paulo (# 872.613, 2014).

Study design and population

The Maternal and Child Health and Nutrition in Acre, Brazil (MINA-Brazil) study is a prospective, population-based birth cohort set-up to examine the impact of a wide range of early exposures on child growth and development in the Amazon [16]. Mother-baby pairs were enrolled at pregnancy in public antenatal clinics, or at birth in the Women and Children's Hospital of Juruá Valley—the only maternity hospital of Cruzeiro do Sul, where 96% of all local deliveries take place [17]. The study site is the most populous municipality of the Upper Juruá Valley, Acre State, next to the Brazil-Peru border (Fig 1). With 89,072 inhabitants estimated in 2020 by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) (<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ac/cruzeiro-do-sul.html>), Cruzeiro do Sul has approximately 72% of its population classified as urban. The area has a typical equatorial humid climate and receives most rainfall between November and April. Malaria transmission occurs year-round and the annual malaria incidence (API; number of laboratory-confirmed clinical malaria cases per 1,000 people per year) was estimated at 231.9 cases per 1,000 inhabitants in 2016, the fourth highest among municipalities in Brazil [18]. The infant mortality rate in Cruzeiro do Sul has been estimated in 2017 at 11.3 deaths among children under one year of age per 1,000 live births (<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ac/cruzeiro-do-sul.html>), compared to the country average of 12.8 deaths per 1,000 live births (<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9126-tabuas-completas-de-mortalidade.html?edicao=23111&t=sobre>).

Baseline and follow-up assessments

Fig 2 shows the study flow chart. At delivery, mothers were interviewed to obtain demographic, lifestyle, and morbidity information. Data on selected household assets were combined to derive a wealth index [19]—a proxy of socioeconomic status. Information on the number of antenatal care visits attended, gestational age at delivery, type of delivery (vaginal or cesarean), and child's sex was retrieved from hospital records [16]. The diagnosis of malaria in pregnancy was defined by combining antenatal diagnosis by microscopy of Giemsa-stained capillary blood thick smears prepared during sick visits to public clinics and species-specific

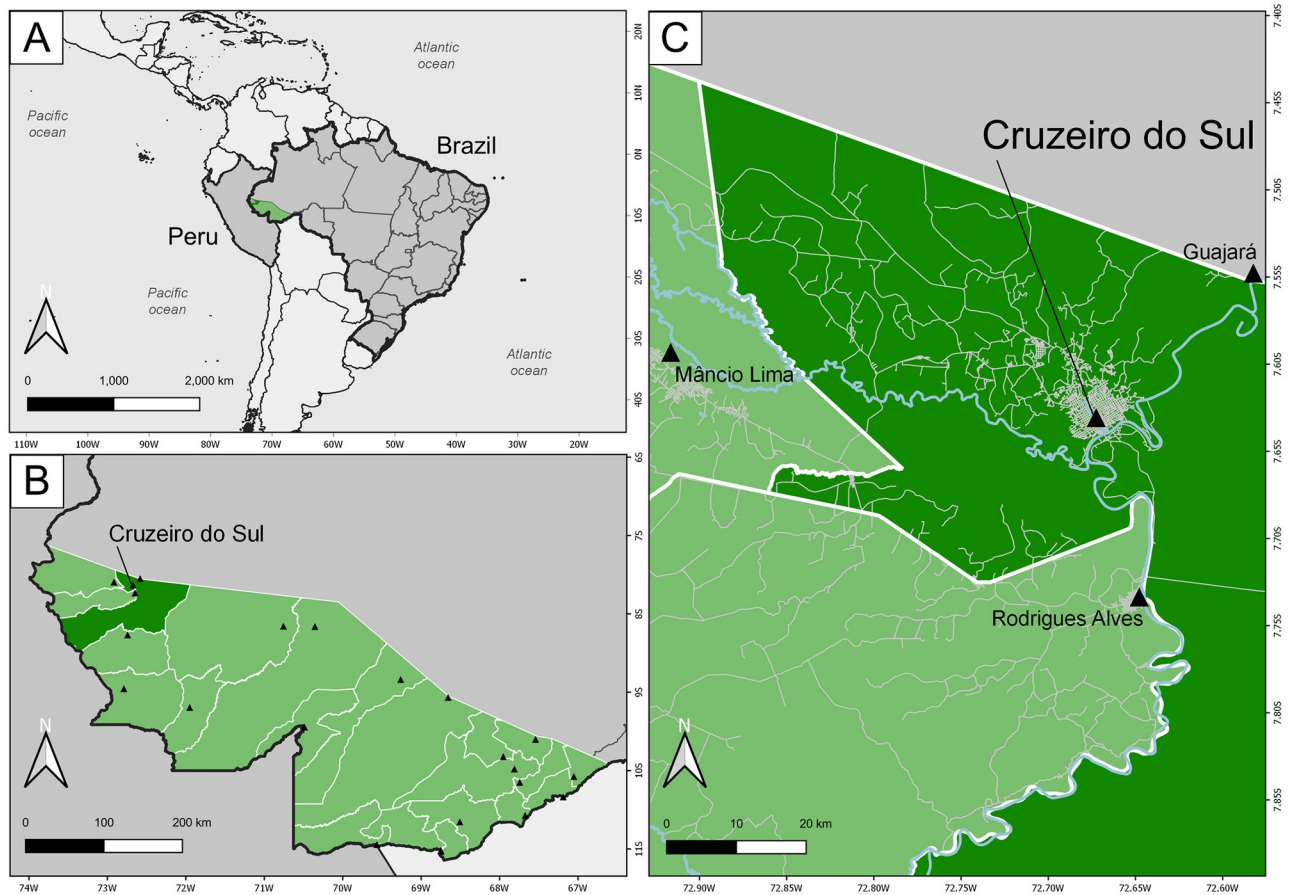


Fig 1. Study site. The map shows Brazil and Peru in South America (panel A) and the location of the municipality of Cruzeiro do Sul (dark green) in the Upper Juruá Valley region, Acre State (light green), northwestern Brazil (panel B). The urban area of Cruzeiro do Sul is shown in greater detail in panel C. Other cities and towns in the region (Mancio Lima, Guajará, and Rodrigues Alves) are also indicated by triangles. Roads and streets are represented in light gray. Rivers are represented in blue. Figure created with QGIS software version 3.14, an open source Geographic Information System (GIS) licensed under the GNU General Public License (<https://bit.ly/2BSPB2F>). Publicly available shape files were obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) website (<https://bit.ly/34gMq0S>). Roads, streets, and rivers were obtained from the Open Street Map Foundation website (<https://bit.ly/3pzh4xp>). All utilized geographical data are under the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568.g001>

real-time PCR [20] carried out on venous blood samples collected at delivery [21]. Once infected with *P. vivax*, 23% of the pregnant women in this setting are estimated to have one or more vivax malaria recurrences over the next 12 weeks. The vast majority (86%) of these early *P. vivax* recurrences are likely relapses [22]. Soon after delivery, neonates had their birth weight measured by registered nurses to the nearest 0.005 kg, using a Toledo Junior portable scale (Toledo, São Bernardo do Campo, Brazil) with 15 kg capacity. Study participants were invited to attend a follow-up assessment at the age of 2 years, except for those living in remote rural communities ($n = 302$), typically with no electricity and cell phone coverage. These were considered ineligible because they could not be reached by telephone or social media. Here we analyze information collected during the follow-up visit at the age of 2 years. Participants in the assessment and those who were lost to follow-up had similar perinatal health profiles, but the proportion of participants from poorest families declined from 24.9% at birth to 19.3% at 2 years, mostly due to the exclusion of children from the remote rural sites [16]. Nurses and research assistants used structured questionnaires to update sociodemographic and morbidity information and ask about feeding practices. They collected 5-ml venous blood samples for a

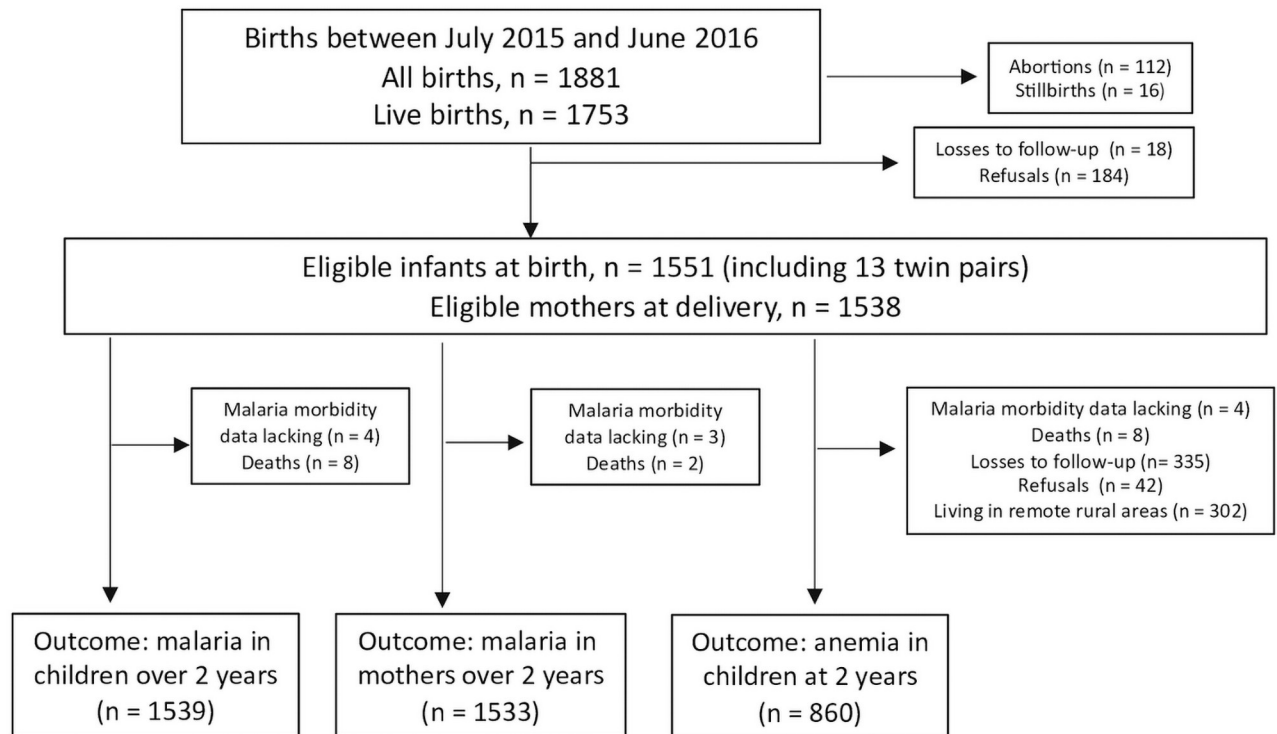


Fig 2. Study flowchart. Between July 2015 and June 2016, pregnant women attending antenatal clinics or admitted for delivery to the maternity ward of the Women and Children's Hospital of Juruá Valley in Cruzeiro do Sul, Brazil, were invited to participate. Reasons for exclusion and the final number of subjects analyzed for each study outcome are indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568.g002>

range of laboratory measurements that included hemoglobin concentrations determined on an ABX Micro 60 automated cell counter (Horiba, Montpellier, France). Anemia was defined by a hemoglobin concentration <110 g/L (<https://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>).

Malaria surveillance

We computed laboratory-confirmed clinical malaria episodes experienced by children from birth until the age of 2 years and by their mothers over the same period. Strategies used to obtain malaria morbidity data have been described elsewhere [22]. Briefly, we retrieved case notifications that matched children's name, sex, and age, in addition to their mothers' name and age, that were entered in the electronic malaria notification database of the Ministry of Health of Brazil (http://200.214.130.44/sivep_malaria/) between July 2015, when the first participants were born, and June 2018, when all study participants had already completed 2 years. The same strategy was used to retrieve clinical malaria cases in mothers up to 2 years after delivery. Access to this database has been granted by the Ministry of Health of Brazil to study the burden of malaria in pregnancy and early infancy in our study site [21]. Because malaria is a notifiable disease and diagnostic testing and antimalarial medications are not available in the private sector, the electronic database comprises virtually all laboratory-confirmed malaria episodes in Brazil [23]. At least 100 fields of Giemsa-stained thick blood smears are routinely examined for malaria parasites under 1000 $\times$ magnification before a slide is declared negative [24]. *Plasmodium vivax* infections were treated with 25 mg/kg of body weight of chloroquine administered orally over three consecutive days and 3.5 mg/kg of primaquine administered

over 7 days. Primaquine was omitted in children over 6 months of age, as recommended by the Ministry of Health of Brazil [25].

Cruzeiro do Sul has been divided, for operational malaria control purposes, into smaller geographic units, or “localities”, with shared epidemiological and ecological characteristics [26]. The central points of the localities (typically a health post or school) were georeferenced using hand-held GPS receivers, all dwellings were identified and given a unique identifier, and all residents were enumerated during periodic census surveys carried out by the local malaria control program staff. We retrieved from the electronic malaria notification database the following locality-related information: (i) GPS coordinates, (ii) total population size, and (iii) number of locally acquired, laboratory-confirmed malaria episodes in the locality between 2016 and 2018. This information was used to calculate the average API per locality between 2016 and 2018, a proxy of malaria transmission intensity in the area of residence of study participants.

Recombinant antigens and antibody measurement in maternal and cord blood plasma

We used three well-characterized blood-stage parasite antigens expressed as recombinant proteins to capture anti-*P. vivax* maternal IgG antibodies: (i) residues 43–487 of the *P. vivax* apical membrane protein (PvAMA1) ectodomain, Brazilian strain, expressed in *Pichia pastoris* [27]; (ii) residues 194–521 of the *P. vivax* Duffy-binding protein (PvDBP) erythrocyte-binding domain, Salvador-I strain, expressed in *Escherichia coli* [28] and kindly provided by Christopher L. King (Case Western Reserve University, Cleveland, OH); and (iii) the C-terminal, 19-kDa region of *P. vivax* merozoite surface protein (MSP) 1 (PvMSP1₁₉), Belém strain, expressed in *E. coli* [29]. Methods for protein expression, purification, and refolding, if required, have been described elsewhere [27–29]. We used enzyme immunoassays (ELISAs) to measure antigen-specific IgG antibodies in 1,095 mothers (71.4% of the total) who provided plasma samples at delivery. Briefly, high-binding 96-well Costar microplates (Corning, Corning, NY) were coated with 50 µL of solid-phase antigen solution in phosphate-buffered saline for 18 h at 4°C. Antigen concentrations optimized for the maximal signal to background ratio were as follows: PvAMA1, 1 µg/mL; PvDBP, 0.025 µg/mL; and PvMSP1₁₉, 0.025 µg/mL. Plasma samples (50 µL/well) were tested at a 1:800 dilution for PvAMA1 and PvMSP1₁₉, or 1:200 for PvDBP. After a 1-h incubation at 37°C, antibody binding to solid-phase antigen was detected with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (SouthernBiotech, Birmingham, AL) at a 1:8,000 dilution. After the use of tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide at acidic pH as a substrate, absorbance values were measured at 450 nm. Reactivity indices (RIs) were calculated as the ratio between the absorbance values of each test sample and a cutoff value for each antigen, corresponding to the average absorbance for plasmas from 10 malaria-naïve donors tested on each microplate plus 3 standard deviations. Positive samples had RIs greater than 1. To test whether maternal antibodies were efficiently transferred to infants, we compared antibody reactivity indices in a subset of 101 randomly selected paired maternal and cord-blood plasma samples from study participants. Importantly, maternal and cord blood antibody levels were strongly correlated to each other over the entire range of values (S1 Fig), consistent with no saturation of the placental FcRn receptor [30] at high maternal IgG levels.

Statistical analysis

Data collected during the baseline and follow-up assessments were entered into tablets programmed with CSPro software (<https://www.census.gov/programs-surveys/international-programs.html>) and transferred to STATA 15.1 (StataCorp, College Station, TX) for statistical

analysis. Standard descriptive statistics were used to summarize the main study outcomes. Proportions were compared using Mantel-Haenszel χ^2 tests for linear trend and correlations were evaluated using the nonparametric Spearman correlation test. Statistical significance was defined at the 5% level. We first computed the monthly incidence of laboratory-confirmed clinical malaria experienced by children ($n = 1,539$) until the age of 2 years and by their mothers ($n = 1,533$) up to 2 years after delivery, with their respective 95% confidence intervals (CIs).

We used negative binomial regression models to identify correlates of malaria risk among children. This analysis comprised all children assessed at delivery, except for those with unavailable API estimates for their areas of residence ($n = 45$). This gives a total of 1,494 children for whom malaria morbidity data from birth to their second birthday were retrieved from the case notification database, or 2,988 person-years of follow-up. Separate regression models were built for two continuous outcomes: (i) total number of laboratory-confirmed clinical malaria episodes among children, irrespective of the infecting parasite species, during their first two years of life and (ii) number of laboratory-confirmed vivax clinical malaria episodes among children during the same period, excluding mixed-species (*P. vivax* plus *P. falciparum*) infections. We excluded mixed-species infections because, in these cases, malaria-related morbidity could be associated with either species or to the interaction between them. Models included the sociodemographic, environmental, gestational, and neonatal covariates listed in S2 Fig and described in detail in S1 Text. We note that: (i) one of the socioeconomic covariates is whether the mother is beneficiary of the *Bolsa Família* program [31] because this Federal conditional cash transfer strategy targets selectively low-income families although not necessarily all poor families participate in it; (ii) gestational night blindness [32] was used as a proxy of vitamin A deficiency; (iii) gestational weight gain was categorized as insufficient, adequate, or excessive as described in [33], and (iv) gestational age at birth was estimated as described in [34]. Variables associated with the outcome at a significance level $<20\%$ in unadjusted analysis were further assessed in negative binomial models. We next used a hierarchical approach based on conceptual frameworks with distal, intermediate and proximal levels of disease determination (S2 Fig) [35], to select covariates that were retained in the final adjusted models. At each level of determination, covariates were retained in downstream analyses if they were associated with the outcome at a significance level of $<10\%$ or if their inclusion in the model changed the risk measures by $\geq 10\%$. Participants with missing values in categorical covariates were maintained in the model by creating a new missing-value category. We provide estimates of incidence rate ratio along with 95% CIs to quantify the influence of a given predictor on the outcome, while controlling for all other covariates retained in the final model, either in the same or more distal hierarchical level.

We used survival analysis to test whether levels of specific maternal antibodies measured at delivery predicted vivax malaria risk in mothers and in their children over the next months. We used Cox proportional hazards models to compare hazard ratios (HRs) for the time to the first vivax malaria episode after delivery in mothers and the first malaria episode experienced by their children ($n = 1,095$) across quintiles of maternal antibody levels, while adjusting for potential confounders. The first quintile (reference) comprises 20% of the study mothers with the lowest RIs. We used the hierarchical framework of disease determination described in S2 Fig to select for covariates to be retained in the final multiple models. The proportional-hazards assumption of Cox models was tested on the basis of Schoenfeld residuals after fitting the final model using the `phptest` STATA command. Because the proportional-hazards assumption was not fulfilled for mothers over the entire 24-month period, we carried out separate analyses for the periods (i) between 0 and 12 months after delivery ($n = 1,095$) and (ii) the period after 12 years after delivery ($n = 981$, excluding mothers who had malaria up to 12 months after delivery). Mothers who experienced malaria were excluded from the second analysis because

their specific antibody status is more likely to have changed following a recent reexposure to the parasite.

We next used multiple logistic regression analysis to test whether previous malaria episodes in children were associated with an increased risk of anemia at the age of 2 years (dichotomic outcome variable). This analysis comprised 860 children who had hemoglobin measurements at the age of approximately 2 years (average, 725.9 days; standard deviation, 44.5 days). Covariates included in the multiple logistic regression models and the hierarchical model for variable selection are shown in S3 Fig; all models controlled for age to account for individual age variation, since children were not exactly 2 years old. To explore the impact of the frequency and timing of malaria episodes, as well as the infecting malaria parasite species, we considered four malaria exposure categories among children in separate models: (i) number of laboratory-confirmed malaria episodes during the first two years of life, caused by any species (0, 1, or 2+), (ii) number of laboratory-confirmed vivax malaria episodes during the first two years of life (0, 1, or 2+), (iii) one or more malaria episodes, any species, ≤ 12 months before the follow-up visit (no vs. yes), and (iv) one or more vivax malaria episodes ≤ 12 months before the follow-up visit (no vs. yes). Estimates of odds ratios along with their 95% CIs were interpreted to reflect the magnitude of the observed association between malaria exposure and anemia while controlling for all other covariates.

Quantile regression was further used to explore the association between prior malaria and hemoglobin levels in children at the 25th, 50th, and 75th hemoglobin quantiles (corresponding to 114 g/L, 121 g/L, and 127 g/L, respectively). To this end, we used the *sqreg* STATA command to estimate β coefficients and their bootstrap 95% confidence intervals while adjusting for the covariates shown in S3 Fig. Quantile regression provides a way of estimating the association between exposures and continuous health outcomes that are not normally distributed [36]; this is the case of hemoglobin concentrations in our study children (Shapiro-Wilk test for normality, $P < 0.001$).

Results

Malaria incidence in early childhood and associated risk factors

Overall, 265 malaria episodes were diagnosed in 110 (7.1%) of the 1,539 study children who were followed up from birth through the age of 2 years. *P. vivax* accounted for 236 (89.1%) of all malaria episodes. Only uncomplicated clinical disease was observed and treated on an ambulatory basis; no child was hospitalized due to malaria. Mothers suffered a total of 497 malaria episodes during the same period, 81.3% of them due to *P. vivax*; 257 (16.8%) of the 1,533 mothers had at least one malaria episode during the follow-up.

During their first 12 months of life, children experienced much fewer vivax malaria episodes than their mothers, with little or no overlap between the 95% CIs of incidence estimates in children and mothers. Thereafter, children become as vulnerable to vivax malaria as their mothers (Fig 3A). Episodes of falciparum or mixed-species malaria remained similarly infrequent in mothers and children over the entire follow-up period (Fig 3B).

The overdispersed frequency distribution of malaria episodes per child, with the variance (0.612) largely exceeding the mean (0.172 episode/child), is properly described by a negative binomial function (S4 Fig). There was a range of 0 to 9 malaria episodes per child, with 0–8 vivax and 0–2 falciparum or mixed-species infections per child. The vast majority of children (92.8%) remained free of malaria until their second birthday, but 21 (1.4%) of them had ≥ 4 episodes and together accounted for 43.4% ($n = 115$) of all malaria episodes.

Malaria incidence was heterogeneously distributed among localities (Fig 4). Not surprisingly, study children living in urban or periurban localities typically experienced fewer or no

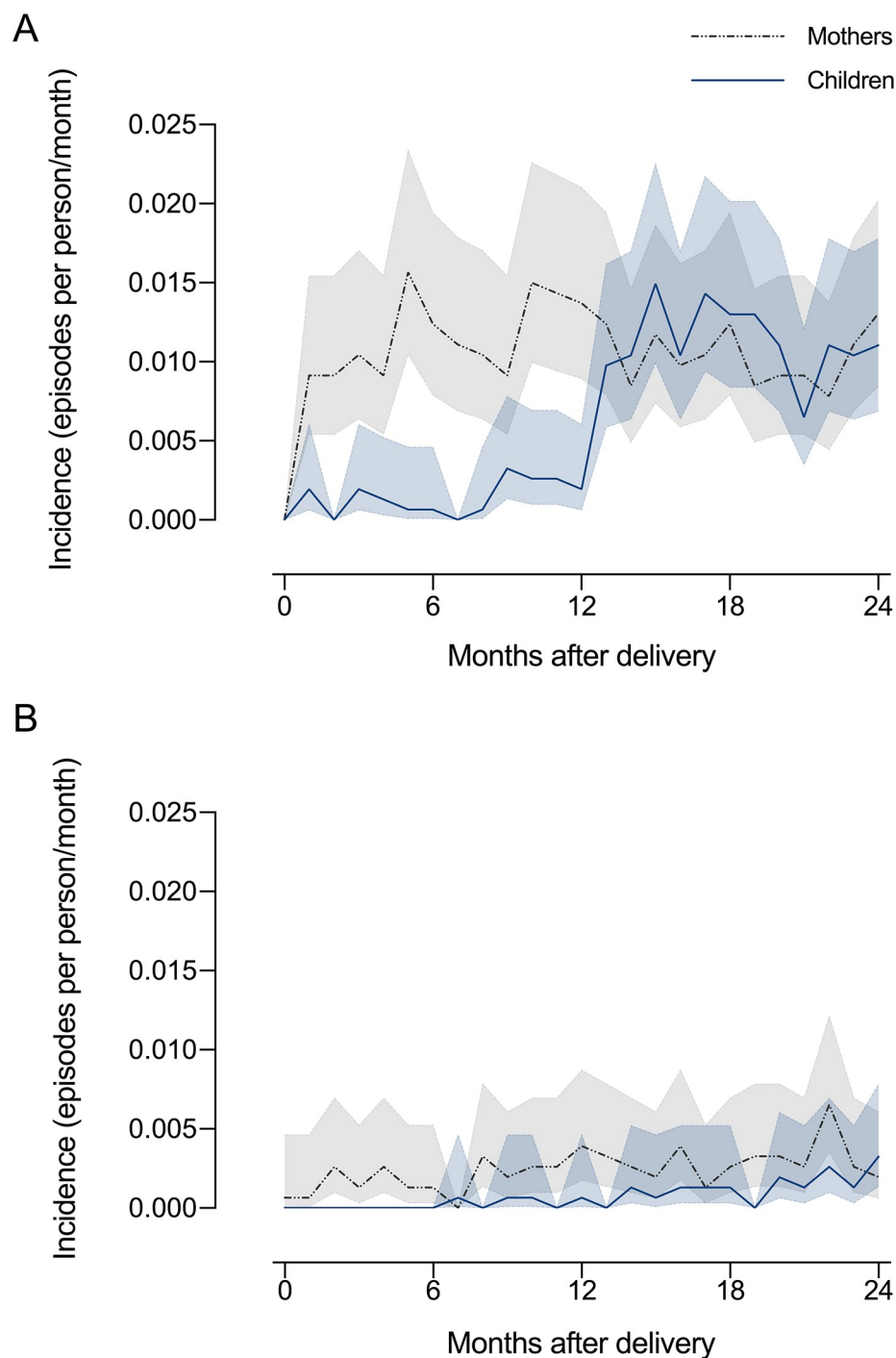


Fig 3. Monthly malaria incidence in mothers and their children. Panel A shows the incidence of laboratory-diagnosed *P. vivax* malaria and their respective 95% confidence intervals among mothers ($n = 1,533$) and their children ($n = 1,539$) participating in the MINA-Brazil study. Panel B shows the incidence of laboratory-diagnosed *P. falciparum* or mixed-species malaria in mothers and children. Each study participant contributed 2 person-years (24 person-months) of follow-up.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568.g003>

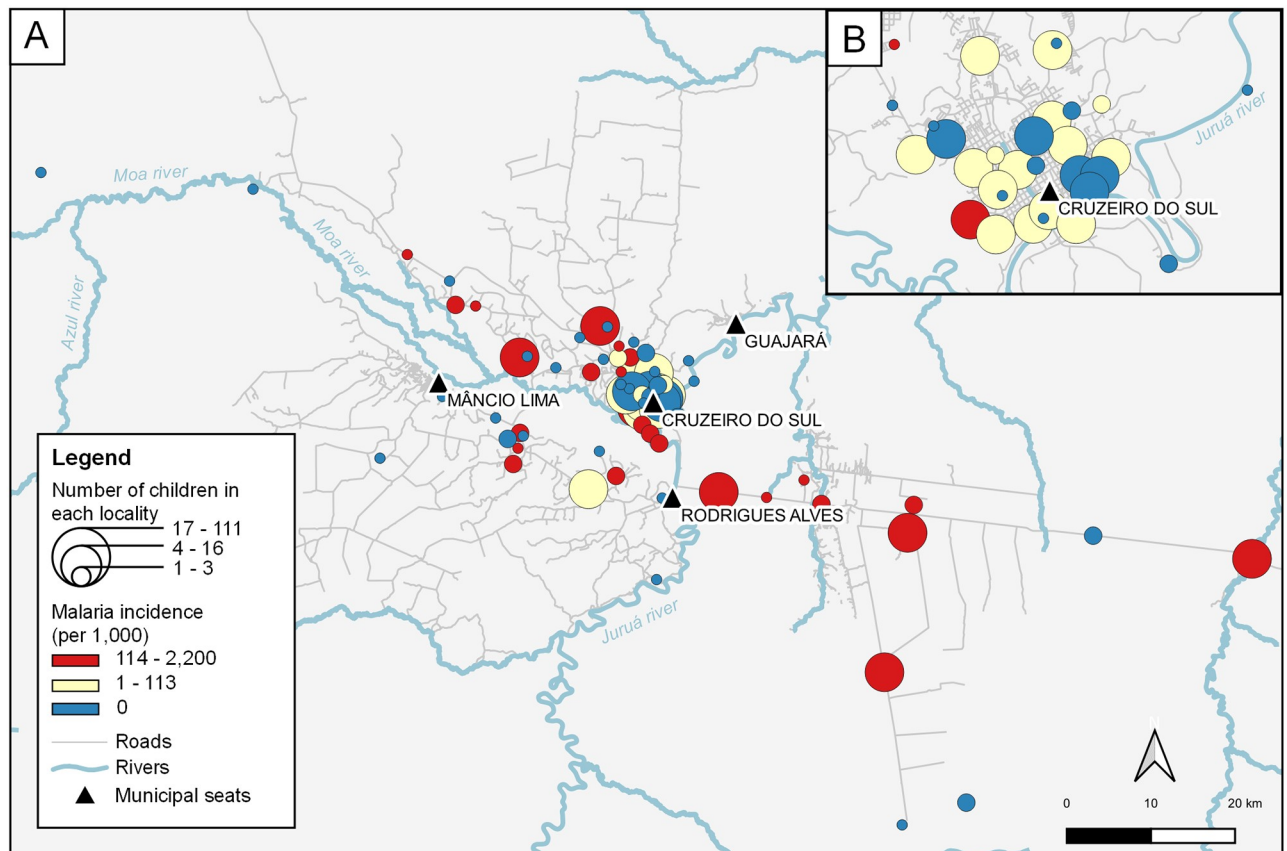


Fig 4. Spatial distribution of malaria incidence among MINA-Brazil study children. The map shows the upper Jurua Valley and the localities of residence of study children (circles) within and surrounding the municipality of Cruzeiro do Sul (A). The inset (B) shows the localities within and next to the urban area. Circle sizes are directly proportional to the number of study participants in each locality and their color (from blue to red) indicates the overall malaria incidence among study participants living in each locality (highest incidence in red). Roads and streets are represented in light gray. Rivers are represented in blue. Figure created with QGIS software version 3.14, an open source Geographic Information System (GIS) licensed under the GNU General Public License (<https://bit.ly/2BSPB2F>). Publicly available shape files were obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) website (<https://bit.ly/34gMq0S>). Roads, streets, and rivers were obtained from the Open Street Map Foundation website (<https://bit.ly/3pzh4xp>). All utilized geographical data are under the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568.g004>

malaria episodes, compared to their counterparts living in more remote rural localities surrounding the city of Cruzeiro do Sul.

Multiple negative binomial regression analysis identified the following significant predictors of malaria risk (any species) and vivax malaria risk in children (Table 1): (i) poverty (least poor children are at decreased risk compared with the poorest ones), (ii) API in the locality of residence, (iii) malaria in pregnancy, and (iv) maternal gravidity (children of secundigravidae are at decreased risk compared to primigravidae). Malaria in pregnancy, diagnosed in 178 (11.9%) mothers [21], was significantly associated with more than twice the risk of subsequent malaria even after controlling for transmission intensity in the children's area of residence. To further explore this association, we reran the negative binomial models with the key adjustment covariate API stratified into quintiles (S1 Text). These alternative models yielded very similar results (S1 Table).

Maternal antibodies and risk of vivax malaria

We detected IgG antibodies to PvAMA1, PvDBP, and PvMSP1₁₉ in 346 (31.8%; 95% CI, 28.8–34.4%), 348 (31.7%; 95% CI, 29.0–34.6%), and 489 (44.4%; 95% CI, 41.7–47.7%) out of 1,095

Table 1. Multiple negative binomial regression analysis of correlates of malaria (all species) and vivax malaria from birth to two years of age in children from the MINA-Brazil birth cohort study (n = 1494).

Covariate	n ^a	Negative binomial regression models					
		Outcome: all malaria species (n = 251)			Outcome: vivax malaria (n = 224)		
		IRR ^b	(95% CI) ^c	P	IRR ^b	(95% CI) ^c	P
Wealth index quartile							
1 (poorest)	341	Reference			Reference		
2	358	0.635	(0.339 1.189)	0.156	0.641	(0.336 1.224)	0.178
3	363	0.597	(0.314 1.135)	0.115	0.635	(0.328 1.230)	0.178
4 (least poor)	364	0.162	(0.058 0.448)	<0.001	0.188	(0.067 0.524)	0.001
Beneficiary of Bolsa Família^d							
No	821	Reference			Reference		
Yes	605	1.956	(1.137 3.364)	0.015	1.977	(1.133 3.449)	0.016
API^e	1494	1.003	(1.002 1.004)	<0.001	1.003	(1.002 1.004)	<0.001
Malaria in pregnancy							
No	1316	Reference			Reference		
Yes	178	2.417	(1.334 4.378)	0.004	2.582	(1.409 4.731)	0.002
Mother's gravidity							
1	570	Reference			Reference		
2	365	0.328	(0.153 0.701)	0.004	0.312	(0.141 0.690)	0.004
3	203	0.797	(0.376 1.689)	0.553	0.860	(0.401 1.846)	0.699
4	118	0.602	(0.239 1.518)	0.282	0.520	(0.198 1.366)	0.185
5+	170	1.250	(0.605 2.582)	0.547	1.279	(0.609 2.686)	0.515

^aTotals across exposure categories may not equal 1494 because of missing information.

^bIRR = Incidence rate ratio.

^cCI = confidence interval.

^dBolsa Família = Federal conditional cash transfer program.

^eAPI = annual parasite incidence in the locality of residence (continuous variable).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568.t001>

maternal plasma samples collected at delivery, respectively. Age-related differences in maternal antibody prevalence were significant for PvAMA1 (Mantel-Haenszel χ^2 test for linear trend, $P = 0.015$), but not for other antigens (Fig 5). Levels of anti-PvAMA1 IgG antibodies were weakly, but significantly correlated with maternal age ($r_s = 0.085$, $P = 0.005$, Spearman correlation test). In contrast, no correlation with age was found for levels of anti-PvDBP IgG ($r_s = 0.024$, $P = 0.434$) or anti-PvMSP1₁₉ IgG ($r_s = 0.014$, $P = 0.640$).

Elevated reactivity indices of specific antibodies at delivery were not associated with protection from vivax malaria among mothers (Fig 6A). On the contrary, we noted an increased risk of vivax malaria in mothers with high antibody levels (quintile 5). Specific antibody levels were significantly and positively associated with the HR for the time to the first vivax malaria in mothers up to 12 months following delivery, after adjusting for potential confounders (Table 2). When we analyzed the period between 12 and 24 months after delivery, we found no association between specific IgG levels measured at delivery and malaria risk (Table 2).

Because vivax malaria was infrequent among study children before the age of 1 year, with only 14 children with complete serological data suffering one or more infections, the association between maternal antibodies and early life malaria could not be properly assessed (Fig 6B). Cox regression models showed no significant association between maternal antibody levels and the overall risk of malaria in children during the first two years of life (Fig 6B and

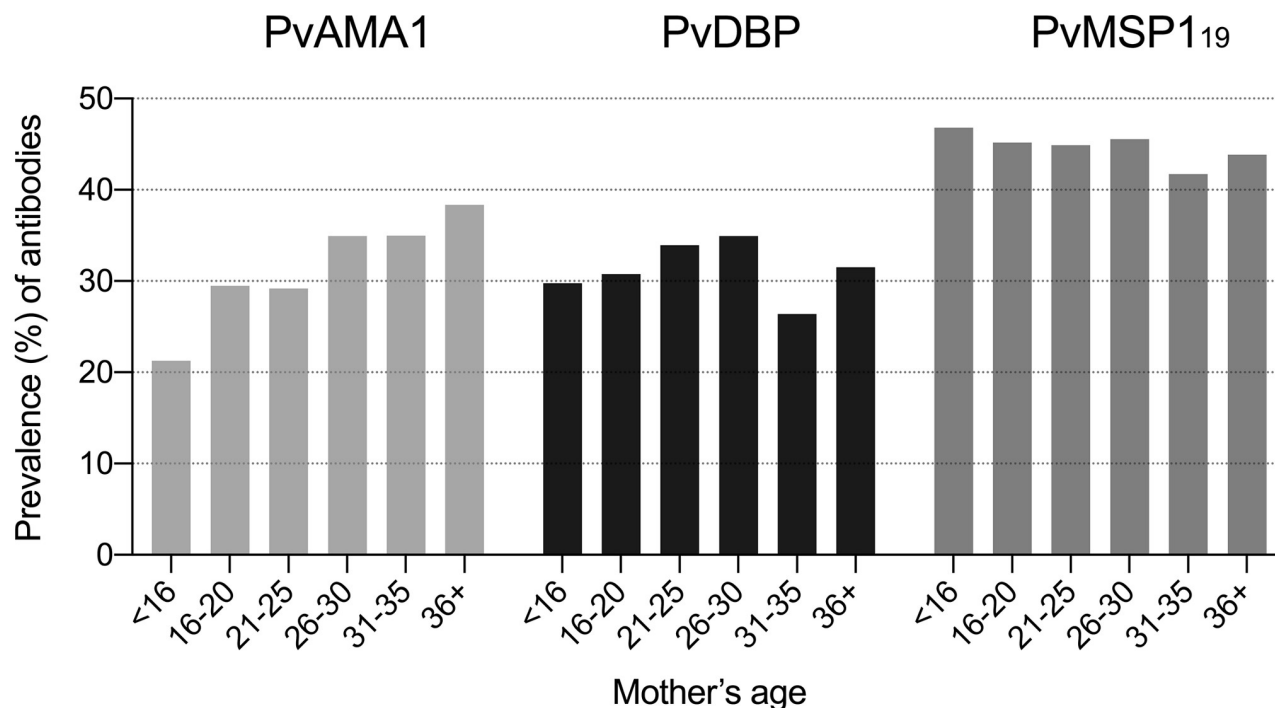


Fig 5. Age-related prevalence of maternal IgG antibodies to the blood-stage *P. vivax* antigens PvAMA1, PvDBP, and PvMSP1₁₉ in MINA-Brazil study participants. Numbers of tested samples per age group were: <16 years, n = 47; 16–20 years, n = 312; 21–25 years, n = 274; 26–30 years, n = 226; 31–35 years, n = 163; and 36+ years, n = 73. Age-related differences in antibody prevalence were significant only for PvAMA-1 (Mantel-Haenszel χ^2 test for linear trend, $P = 0.015$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568.g005>

Table 2). However, given the small number of vivax malaria episodes and the wide 95% CIs, we do not interpret these negative findings as a definitive proof of lack of any association.

Malaria and anemia in early childhood

A total of 108 (12.6%; 95% CI, 10.5–15.0%) of the 860 children tested at approximately 2 years of age had anemia (hemoglobin concentration <110 g/L). No study participant had <70 g/L of hemoglobin, a level that defines severe anemia (<https://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>). Significant correlates of increased risk of anemia at the 2-year follow-up visit (among the covariates listed in S3 Fig) were: (i) increasing child age, (ii) child reporting recent vomiting, (iii) mother assisted by the *Bolsa Família* conditional cash transfer program (a proxy of, but not necessarily synonymous with poverty), (iv) mother reporting gestational hypertension, and (v) maternal anemia at delivery (Table 3). Gestational night blindness was significantly associated with decreased anemia risk, but we have no clear-cut explanation for this finding. The association between malaria since birth (regardless of the species, number, or timing of episodes) and anemia did not reach statistical significance (Table 3). However, repeated and recent malaria episodes (<12 months before the follow-up assessment), even those caused by the putatively more benign parasite *P. vivax*, significantly increased the risk of anemia at the age of 2 years (Fig 7). We note that many of the study children who are highly exposed to malaria live in hard-to-reach rural localities (Fig 4) and were not assessed for hemoglobin levels at the 2-year follow-up visit.

Quantile regression analysis further confirmed the association between repeated vivax malaria episodes and decreased hemoglobin. Results were significant for the 25th percentile

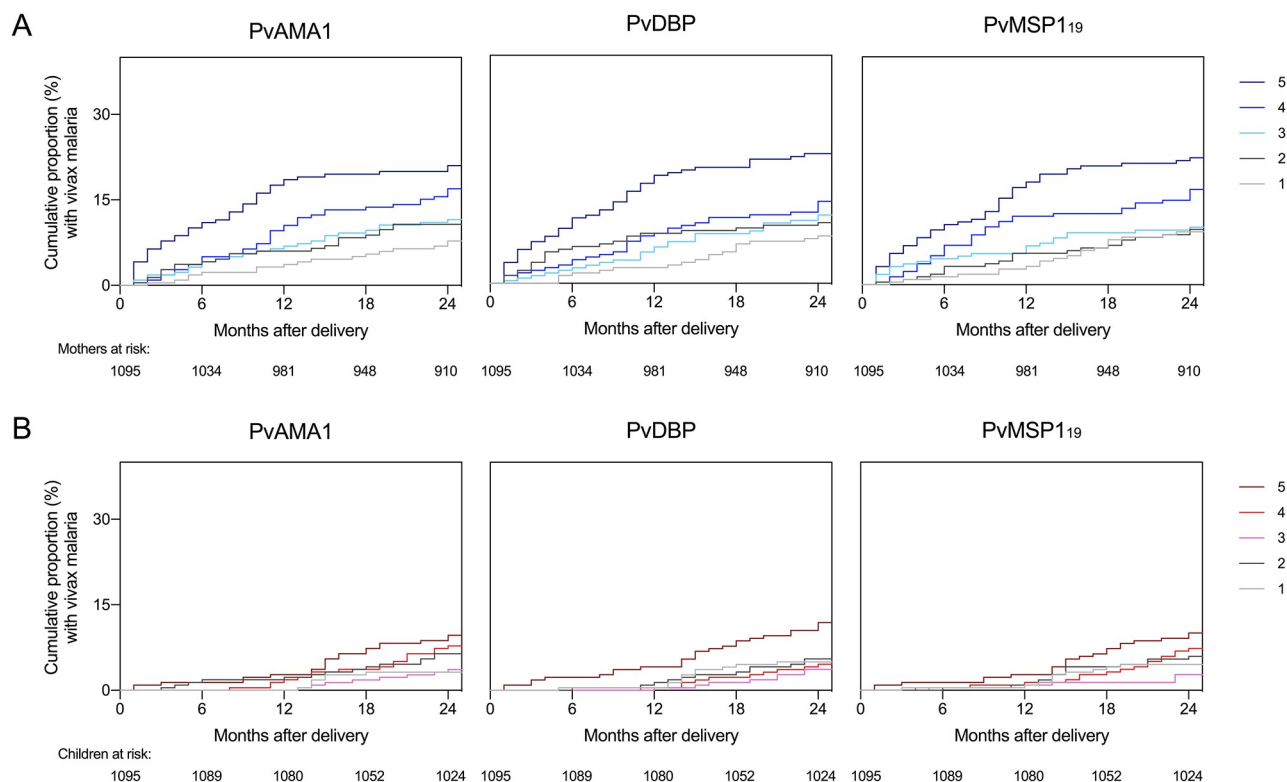


Fig 6. Maternal antibodies and risk of *Plasmodium vivax* malaria. Cumulative proportions of mothers (A) and their children (B) participating in the MINA-Brazil study who had vivax malaria over 2 years of follow-up are shown according to levels of antibodies to the blood-stage *P. vivax* antigens PvAMA-1, PvDBP, and PvMSP1₁₉ measured at delivery and stratified in quintiles (1 = lowest antibody levels). Children and mothers were censored at the time they had falciparum malaria.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568.g006>

(-5.10 g/L [95% CI, -9.71 to -0.50 g/L]) and the 50th percentile of hemoglobin values (-6.35 g/L [95% CI, -12.44 to -0.26 g/L]), after adjusting for child age and sex, wealth index, whether the mother is beneficiary of the *Bolsa Família* program (no vs. yes), maternal schooling, whether the mother is the household head, household size, maternal anemia at delivery, and gestational age (S2 Table).

Discussion

We have examined the burden of *P. vivax* infection in the course of the first 1000 days—from conception to child's second birthday—in the MINA-Brazil cohort study. Vivax malaria in pregnancy in this population-based cohort was previously shown to be associated with increased risk of maternal anemia and impaired fetal growth [21]. Here, we show that young infants are little exposed to, or largely protected from infection, but children >12 months of age appear to be as vulnerable to vivax malaria as their mothers. High levels of anti-*P. vivax* maternal antibodies measured at delivery do not protect mothers and their offspring from future infections. Importantly, multiple vivax malaria episodes among children are associated with increased risk of anemia in early life in this relatively low-endemicity setting.

Only 7.1% of the cohort children ever suffered a malaria episode during their first 2 years of life in the main transmission hotspot of Amazonian Brazil, and the vast majority of infections were due to *P. vivax*. However, infection risk is very heterogeneous. A handful of high-risk children had ≥ 4 infections and together accounted for >40% of malaria episodes diagnosed in

Table 2. Cox proportional hazards models for time to the first vivax malaria in mothers (0–12 months after delivery [n = 1095] and 12–24 months after delivery [n = 981]) and children (24 months of follow-up since birth; n = 1095) from the MINA-Brazil birth cohort study.

Population	Outcome	Antigen	HR ^c according to antibody quintile		95% CI ^d	P
Mothers (n = 1095)	Time to the first vivax malaria within 1 year after delivery (96 failures) ^a	PvAMA1	1	Reference		
			2	1.716	(0.683 4.308)	0.251
			3	1.918	(0.773 4.755)	0.160
			4	2.362	(0.999 5.582)	0.050
			5	2.935	(1.255 6.865)	0.013
		PvDBP	1	Reference		
			2	3.271	(1.304 8.207)	0.012
			3	1.794	(0.671 4.796)	0.244
			4	2.695	(1.067 6.803)	0.036
			5	3.755	(1.544 9.131)	0.004
		PvMSP1 ₁₉	1	Reference		
			2	2.022	(0.754 5.421)	0.162
			3	2.236	(0.848 5.898)	0.104
			4	3.433	(1.401 8.411)	0.007
			5	3.672	(1.508 8.937)	0.004
Mothers (n = 981) ^e	Time to the first vivax malaria between 12 and 24 months after delivery (51 failures) ^a	PvAMA1	1	Reference		
			2	0.987	(0.410 2.380)	0.977
			3	1.131	(0.480 2.665)	0.778
			4	1.478	(0.657 3.322)	0.345
			5	0.534	(0.175 1.627)	0.269
		PvDBP	1	Reference		
			2	0.339	(0.109 1.053)	0.061
			3	1.175	(0.542 2.545)	0.683
			4	1.094	(0.497 2.408)	0.823
			5	0.711	(0.280 1.803)	0.472
		PvMSP1 ₁₉	1	Reference		
			2	0.591	(0.254 1.377)	0.223
			3	0.631	(0.272 1.460)	0.281
			4	0.699	(0.308 1.586)	0.392
			5	0.659	(0.274 1.582)	0.350
Children (n = 1095)	Time to the first vivax malaria in the first 2 years of life (67 failures) ^b	PvAMA1	1	Reference		
			2	1.556	(0.621 3.900)	0.345
			3	1.054	(0.381 2.915)	0.919
			4	1.472	(0.592 3.661)	0.405
			5	1.092	(0.430 2.776)	0.853
		PvDBP	1	Reference		
			2	1.083	(0.474 2.470)	0.851
			3	0.507	(0.200 1.282)	0.151
			4	0.713	(0.299 1.698)	0.445
			5	0.975	(0.452 2.103)	0.948
		PvMSP1 ₁₉	1	Reference		
			2	1.088	(0.471 2.515)	0.843
			3	0.460	(0.165 1.281)	0.137
			4	1.015	(0.449 2.290)	0.972
			5	0.814	(0.360 1.841)	0.621

^aCox proportional hazards model adjusted for household wealth index (quartiles), annual parasite Incidence (API) in the area of residence, and malaria in pregnancy (no vs. yes).

^bCox proportional hazards model adjusted for household wealth index (quartiles), annual parasite Incidence (API) in the area of residence (continuous variable), and malaria in pregnancy (no vs. yes), gravidity (0, 1, 2, 3, or 4+), and prenatal alcohol use (no vs. yes).

^cHR = hazard ratio

^dCI = confidence interval.

^eMothers who had malaria up to 12 months after delivery were excluded.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568.t002>

Table 3. Multiple logistic regression analysis of correlates of anemia (hemoglobin concentration <110 g/L) at two years of age in children from the MINA-Brazil birth cohort study (n = 860).

Variables	n ^b	Outcome: anemia at the age of 2 years (n = 108)		
		OR ^c	95% CI ^d	P
Child's sex				
Female	429	Reference		
Male	431	1.415	(0.930 2.151)	0.105
Child's age (days)	860	1.005	(1.001 1.009)	0.024
Mother beneficiary of the Bolsa Família program^a				
No	452	Reference		
Yes	408	1.860	(1.217 2.843)	0.004
Maternal anemia at delivery				
No	494	Reference		
Yes	320	1.736	(1.133 2.659)	0.011
Gestational night blindness				
No	769	Reference		
Yes	91	0.410	(0.172 0.976)	0.044
Child vomiting in the last 15 days				
No	739	Reference		
Yes	121	1.902	(1.126 3.215)	0.016
Malaria since birth, any species				
No	828	Reference		
Yes	32	2.241	(0.965 5.205)	0.061

^aBolsa Família = Federal conditional cash transfer program.^bTotals across exposure categories do not equal 860 because of missing information^cOR = Odds ratio.^dCI = confidence interval.<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568.t003>

study participants. The highest malaria incidence was observed in rural localities (Fig 4), where effective control measures are harder to implement compared with urban and periurban settings.

Neonates and young infants <6 months of age typically experience fewer malaria episodes than older infants and children [7], although early life infections may not be uncommon in some African settings [37]. Here, we show that vivax malaria remains infrequent far beyond the age of 6 months; in fact, until the infant's first birthday (Fig 3). Importantly, maternal antibodies transferred to the fetus and erythrocytes with high fetal hemoglobin concentration are unlikely to circulate for >6 months and account for the reduced risk in older infants [5]. Breastfeeding may confer only short-term protection to MINA-Brazil cohort participants because their median duration of exclusive breastfeeding is as short as 16 days [38].

Maternal antibodies have been hypothesized but not conclusively shown to reduce the risk of *P. vivax* infection in young infants [5]. One may argue that passively transferred immunity is unlikely to work in the infant while the mother continues to suffer from malaria, as we have observed in our cohort participants (Fig 3). However, conventional serology detects both protective and nonprotective antibodies and high antibody levels may indicate increased exposure rather than reduced risk [39]. The fine specificity and functional properties of parasite-inhibitory anti-*P. vivax* antibody responses remain largely unexplored [39,40]. The positive association between antibodies measured at delivery and subsequent malaria risk in mothers disappeared over the second year of follow-up (Table 2), suggesting that antibodies essentially

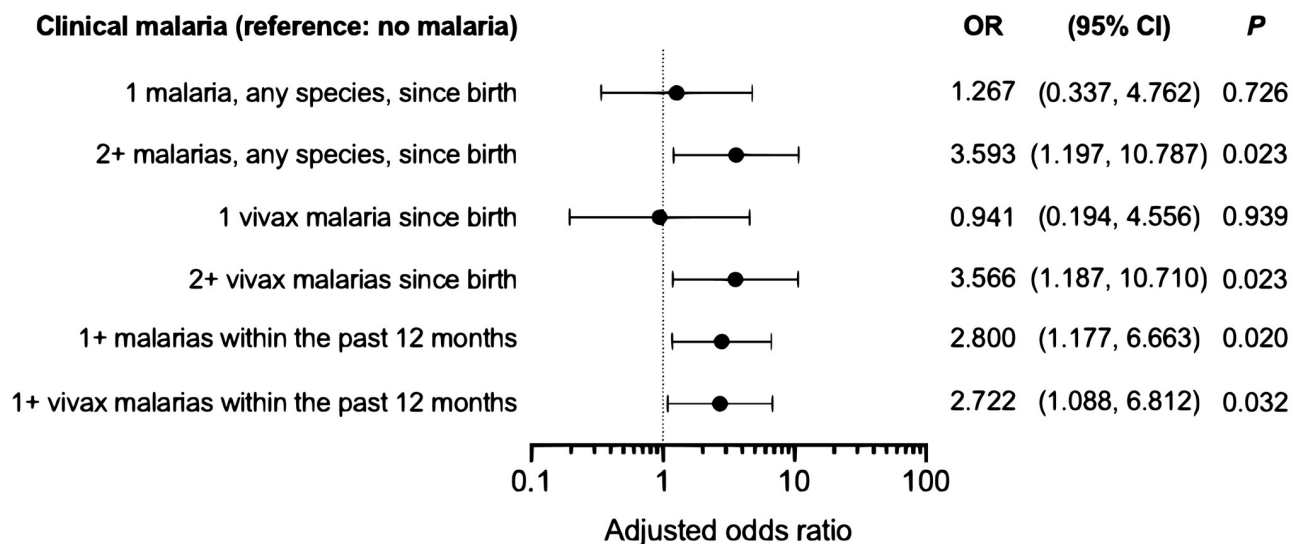


Fig 7. Impact of the frequency and timing of malaria episodes, as well as the infecting malaria parasite species, on the risk of anemia. Odds ratios (OR) indicate the magnitude of association between anemia at the age of 2 years and malaria type (any species or vivax), frequency (1 or 2+), or timing (since birth or within the last 12 months) in MINA-Brazil study participants ($n = 860$), compared with no malaria, while controlling for the potential confounders listed in Table 3. OR estimates and their respective 95% confidence intervals (95% CIs) and P value were derived from separate multiple logistic regression models in which exposure to malaria was introduced in different ways.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009568.g007>

indicate recent malaria exposure, but not future long-term malaria exposure or risk. Antibody concentration may also matter for infant protection. Levels of parasite-inhibitory antibodies that fail to protect heavily exposed mothers may suffice to protect their less exposed offspring if placental transfer to the fetus during pregnancy is efficient.

We hypothesize that infants <12 months are infrequently infected because they remain largely unexposed to vectors. First, they are little affected by outdoor malaria transmission, which predominates over indoor transmission in most of the Amazon [15], until they start to walk and actively explore the external environment. Second, infants may be less attractive to mosquito vectors than older children [41], partially due to their smaller body size. Third, long-lasting insecticide-treated bed nets, which are available in high-transmission localities across the study site [42], are likely to avert more infectious bites among infants who typically sleep >12 hours per day, compared with older children.

Children born to mothers who suffered from malaria in pregnancy are at a significantly elevated risk of malaria [43]. Indeed, malaria disproportionally affects pregnant women living in transmission hotspots, where their offspring is also more likely to be infected. However, we show that this positive association persists after controlling for local API, a proxy of malaria transmission intensity in the area of residence of mother-child pairs (Table 1). We acknowledge some risk of residual confounding, since all mother-child pairs living in the same locality are assigned the same API but may still differ in malaria risk. The increased risk is not due to congenital transmission either. Indeed, congenital malaria is rare in the study site; only 6 of 637 (0.9%) neonates in this cohort tested positive for parasite DNA in cord blood samples collected at delivery [21]. Placental pathology leading to prenatal exposure to *P. falciparum* antigens may offer an explanation, as these antigens can modulate fetal immune responses [44] and induce an immune tolerant phenotype associated with increased risk of malaria and other early childhood infections [44,45]. It is debatable whether this holds for *P. vivax*, the locally dominant parasite that does not sequester massively in the intervillous spaces and causes less severe histological changes in the placenta [46].

Childhood anemia remains common in the Amazon, with 20–48% of the infants and toddlers found to be anemic and 62–81% found to be iron deficient in recent surveys in Amazonian Brazil [47,48]. Vitamin A, vitamin B12, and folate deficiencies are substantially less prevalent (4–13%) in Amazonian children [49]. Although we found much less anemia among MINA-Brazil cohort participants at the age of 2 years (prevalence, 12.6%), compared with proximate sites in the Amazon [47,48], we note that hemoglobin measurements were made in 76.6% of the study participants at the 1-year follow-up visit [16] and those with anemia (41.0% [95% CI, 37.3 to 44.8%]) were prescribed iron supplements. Treatment was unsupervised, but most anemic children may have had a sustained hemoglobin response following oral iron administration.

Importantly, anemia is widely recognized as the main adverse health outcome of vivax malaria in children [7]. Severe anemia is more prevalent in regions where malaria transmission is intense and hemoglobin concentrations are already low prior to infection, due to multiple micronutrient deficiencies [50]. Accordingly, vivax malaria accounts for nearly 28% of all episodes of moderate or severe anemia diagnosed among infants from Papua, Indonesia [13]. Despite the lower average parasite densities in *P. vivax*, compared with *P. falciparum* infections, uninfected red blood cell removal appears to be proportionally greater in vivax malaria, resulting in a similar red blood cell loss for both species [50]. The burden of anemia attributable to repeated vivax malaria largely exceeds that caused by *P. falciparum* in young children from high-endemicity areas in the Asia-Pacific region [12].

We show that repeated and recent *P. vivax* infections are associated with a significantly increased risk of anemia at the age of 2 years in a relatively low transmission setting (Fig 7). This association is likely to be causal, but residual confounding must also be considered given that both malaria and anemia tend to affect the poorest individuals in the community. Vivax malaria in pregnancy is also positively associated with maternal anemia at delivery and poorer birth outcomes in the MINA-Brazil cohort [21] and children born to anemic mothers are more likely to be anemic by their second birthday, after controlling for potential confounders (Table 3). Recurrent infections with *P. vivax* are common due to its ability to stay dormant in the liver and cause relapses within months after a single mosquito inoculation [51]. Relapses may occur shortly after the primary infection, before the child's hemoglobin concentration has returned to normal. Although primaquine is routinely prescribed with chloroquine to suppress *P. vivax* relapses in Latin America [1], infants <6 months of age with unknown glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency status are considered primaquine-ineligible in Brazil because of the risk of hemolysis [25]. As G6PD testing is not widely available, young infants are very rarely prescribed primaquine. Moreover, not all eligible children and adults adhere to the unsupervised 7-day primaquine treatment [52] and shortened anti-relapse regimens are urgently needed [53].

The present study has some limitations. First, malaria episodes in study children were retrieved retrospectively from a case notification database and no blood samples were available for further confirmatory diagnostic tests. We assume that nearly all clinical malaria episodes confirmed by microscopy and treated in cohort participants were retrieved [23], but routine surveillance overlooks transient or chronic submicroscopic (often asymptomatic) parasitemias that do not develop into detectable infections but may cause anemia [54]. Our study design does not allow for the estimation of the adverse health effects of submicroscopic or asymptomatic infections. Second, analyses of passively detected malaria episodes are prone to biases due to differences in access to health facilities and health-seeking behavior. Third, the impact of malaria on anemia may have been underestimated because cohort participants living in remote rural areas, who are more heavily exposed to malaria and putatively more prone to its more severe consequences, were not eligible for the follow-up visit at the

age of 2 years. Fourth, because of the rarity of the outcome of interest in young infants living in urban and proximate rural areas, our study was relatively underpowered to address the association between antibody levels measured in mothers at delivery and the risk of vivax malaria in their offspring during the first months of life. Finally, the infrequency of *P. falciparum* malaria in the study population precludes between-species comparisons of malaria risk factors and clinical impact.

Conclusion

Here, we show that the adverse effects of malaria exposure *in utero* extend into early childhood: antenatal infection in mothers is associated with an elevated risk of *P. vivax* malaria in their offspring. Repeatedly infected children are at increased risk of anemia at the age of 2 years. In conclusion, we have identified cumulative adverse effects of *P. vivax* infections that are often overlooked in low transmission settings and further challenge the traditional view of vivax malaria as a relatively benign infection in pregnancy and early childhood. There is an urgent need for improved strategies for vivax malaria prevention during the first 1000 days of life, which may include the systematic use of weekly chloroquine prophylaxis following vivax malaria treatment in pregnancy [22] and malaria screening during routine antenatal [55] and infant care in endemic settings.

Supporting information

S1 STROBE checklist. STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cohort studies: Low-level Plasmodium vivax exposure, maternal antibodies, and anemia in early childhood: population-based birth cohort study in Amazonian Brazil*. (PDF)

S1 Text. Supplementary Methods. (PDF)

S1 Table. Multiple negative binomial regression analysis of correlates of malaria (all species) and vivax malaria from birth to two years of age in children from the MINA-Brazil birth cohort study (n = 1494). In these models, API was entered as a categorical variable (stratified into quintiles). (PDF)

S2 Table. Adjusted coefficients and bootstrap 95% confidence intervals (CI) of malaria exposures associated with hemoglobin concentration (g/L) at two years of age, as estimated using quantile regression analysis for children from the MINA-Brazil birth cohort study. (PDF)

S1 Fig. Levels of specific antibodies (reactivity indices) in 101 paired maternal and cord-blood plasma samples from MINA-Brazil study participants. The continuous diagonal line represents identical antibody levels in maternal and cord-blood samples. Spearman correlation coefficients were 0.814 for anti-PvAMA1 antibodies, 0.801 for anti-PvDBP antibodies, and 0.858 anti-PvMSP1₁₉ antibodies ($P < 0.0001$ for all). (PDF)

S2 Fig. Hierarchical conceptual framework for selection of correlates of malaria risk in early childhood. (PDF)

S3 Fig. Hierarchical conceptual framework for selection of correlates of anemia risk in early childhood.

(PDF)

S4 Fig. Frequency distribution of the number of malaria episodes in the study population.

Bars show the number of laboratory-diagnosed malaria episodes per child over the first two years of life (empirical data) and the continuous line shows the negative binomial function fitted to data. Both panels show the same data, but y-axis values in the right panel are square root-transformed to improve data visualization.

(PDF)

Acknowledgments

The authors thank all participants in the MINA-Brazil Study. The teams at the Maternity Hospital, Municipal Health Secretariat, and primary health care units of Cruzeiro do Sul are gratefully acknowledged. We thank Paola B. Marchesini (Ministry of Health, Brasília, Brazil) for granting access to the electronic malaria notification database and Natália S. Ferreira for providing non-endemic control plasmas. Investigators of MINA-Brazil Study Group comprise: Alicia Matijasevich, Bárbara H. Lourenço, Jenny Abanto, Máira B. Malta, Marcelo U. Ferreira, Marly A. Cardoso, Paulo Augusto R. Neves, and Suely G. A. Gimeno (University of São Paulo, São Paulo, Brazil); Ana Alice Damasceno, Bruno P. da Silva, and Rodrigo M. de Souza (Federal University of Acre, Cruzeiro do Sul, Brazil); Simone Ladeia-Andrade (Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil); and Marcia C. Castro (Harvard T. H. Chan School of Public Health, Boston, USA).

Author Contributions

Conceptualization: Anaclara Pincelli, Marly A. Cardoso, Marcia C. Castro, Marcelo U. Ferreira.

Data curation: Marly A. Cardoso, Máira B. Malta.

Formal analysis: Anaclara Pincelli, Marly A. Cardoso, Igor C. Johansen, Rodrigo M. Corder, Marcelo U. Ferreira.

Funding acquisition: Anaclara Pincelli, Marly A. Cardoso, Marcia C. Castro, Marcelo U. Ferreira.

Investigation: Anaclara Pincelli, Marly A. Cardoso, Máira B. Malta, Vanessa C. Nicolete, Marcelo U. Ferreira.

Methodology: Marly A. Cardoso, Vanessa C. Nicolete, Marcelo U. Ferreira.

Project administration: Marly A. Cardoso.

Software: Rodrigo M. Corder.

Supervision: Marly A. Cardoso, Irene S. Soares, Marcia C. Castro, Marcelo U. Ferreira.

Visualization: Anaclara Pincelli, Igor C. Johansen.

Writing – original draft: Anaclara Pincelli, Marly A. Cardoso, Irene S. Soares, Marcia C. Castro, Marcelo U. Ferreira.

Writing – review & editing: Anaclara Pincelli, Marly A. Cardoso, Máira B. Malta, Igor C. Johansen, Rodrigo M. Corder, Vanessa C. Nicolette, Irene S. Soares, Marcia C. Castro, Marcelo U. Ferreira.

References

1. Ferreira MU, Castro MC. Malaria situation in Latin America and the Caribbean: residual and resurgent transmission and challenges for control and elimination. *Methods Mol Biol*. 2019; 2013:57–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9550-9_4 PMID: 31267493
2. World Health Organization. World Malaria Report 2020. Geneva: World Health Organization, 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>.
3. Price RN, Commons RJ, Battle KE, Thriemer K, Mendis K. *Plasmodium vivax* in the era of the shrinking *P. falciparum* map. *Trends Parasitol*. 2020; 36:560–570. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.03.009> PMID: 32407682
4. Maitland K. Management of severe paediatric malaria in resource-limited settings. *BMC Med*. 2015; 13:42. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0263-6> PMID: 25858094
5. Dobbs KR, Dent AE. *Plasmodium* malaria and antimalarial antibodies in the first year of life. *Parasitology*. 2016; 143:129–38. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001626> PMID: 26743626
6. Crawley J, Chu C, Mtove G, Nosten F. Malaria in children. *Lancet*. 2010; 375:1468–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60447-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60447-3) PMID: 20417858
7. Ashley EA, Poespoprodjo JR. Treatment and prevention of malaria in children. *Lancet Child Adolesc Health*. 2020; 4:775–789. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(20\)30127-9](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(20)30127-9) PMID: 32946831
8. Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med*. 2008; 5:e127. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050127> PMID: 18563961
9. Beeson JG, Chu CS, Richards JS, Nosten F, Fowkes FJ. *Plasmodium vivax* malaria: challenges in diagnosis, treatment and elimination. *Pediatr Infect Dis J*. 2015; 34:529–31. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000671> PMID: 25806841
10. Douglas NM, Kenangalem E, Hasanuddin A, Anstey NM, Sugiarto P, Price RN, et al. Malaria-related hospitalization during childhood in Papua, Indonesia: A retrospective cohort study. *PLoS One*. 2020; 15:e0228018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228018> PMID: 31995581
11. Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Hasanuddin A, Warikar N, et al. Vivax malaria: a major cause of morbidity in early infancy. *Clin Infect Dis*. 2009; 48:1704–1712. <https://doi.org/10.1086/599041> PMID: 19438395
12. Douglas NM, Lampah DA, Kenangalem E, Simpson JA, Poespoprodjo JR, Sugiarto P, et al. Major burden of severe anemia from non-falciparum malaria species in Southern Papua: a hospital-based surveillance study. *PLoS Med*. 2013; 10:e1001575. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001575> PMID: 24358031
13. Kenangalem E, Karyana M, Burdarm L, Yeung S, Simpson JA, Tjitra E, et al. *Plasmodium vivax* infection: a major determinant of severe anaemia in infancy. *Malar J*. 2016; 15:321. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1373-8> PMID: 27306221
14. Lee G, Yori P, Olortegui MP, Pan W, Caulfield L, Gilman RH, et al. Comparative effects of vivax malaria, fever and diarrhoea on child growth. *Int J Epidemiol*. 2012; 41:531–9. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr190> PMID: 22258823
15. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016; 15:284. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1335-1> PMID: 27206924
16. Cardoso MA, Matijasevich A, Malta MB, Lourenco BH, Gimeno SGA, Ferreira MU, et al. Cohort profile: The Maternal and Child Health and Nutrition in Acre, Brazil, birth cohort study (MINA-Brazil). *BMJ Open*. 2020; 10:e034513. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-034513> PMID: 32071188
17. DATASUS, 2018. Sistema de Informação Sobre Nascidos Vivos, Cruzeiro do Sul, AC [in Portuguese]. <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=060702>.
18. World Health Organization. World Malaria Report 2018. Geneva, World Health Organization, 2018. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>
19. Filmer D, Pritchett LH. Estimating wealth effects without expenditure data—or tears: an application to educational enrollments in states of India. *Demography*. 2001; 38: 115–132. <https://doi.org/10.1353/dem.2001.0003> PMID: 11227840
20. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatón K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR

- assays. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 5636–5643. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004> PMID: 15583293
21. Pincelli A, Neves PAR, Lourenço BH, Corder RM, Malta MB, Sampaio-Silva J, et al. The hidden burden of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy in the Amazon: an observational study in northwestern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2018; 99:73–83. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0135> PMID: 29741155
 22. Corder RM, de Lima ACP, Khoury DS, Docken SS, Davenport MP, Ferreira MU. Quantifying and preventing *Plasmodium vivax* recurrences in primaquine-untreated pregnant women: An observational and modeling study in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14:e0008526. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008526> PMID: 32735631
 23. Daher A, Silva JCAL, Stevens A, Marchesini P, Fontes CJ, ter Kuile FO, Lalloo DG. Evaluation of *Plasmodium vivax* malaria recurrence in Brazil. *Malar J*. 2019; 18:18. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2644-y> PMID: 30670020
 24. Ministry of Health of Brazil. Manual of laboratory diagnosis of malaria [in Portuguese]. Brasília, Ministry of Health of Brazil, 2005. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria_diag_manual_final.pdf
 25. Ministry of Health of Brazil. Practical guidelines for malaria therapy [in Portuguese]. Brasília, Ministry of Health of Brazil, 2010. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf
 26. World Health Organization. A framework for malaria elimination. Geneva, World Health Organization, 2017. <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241511988/en/>
 27. Vicentin EC, Françoise KS, Rocha MV, Iourtov D, Dos Santos FL, Kubrusly FS, et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. *Infect Immun*. 2014; 82:1296–307. <https://doi.org/10.1128/IAI.01169-13> PMID: 24379279
 28. Grimberg BT, Udomsangpetch R, Xainli J, McHenry A, Panichakul T, Sattabongkot J, et al. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS Med*. 2007; 4:e337. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040337> PMID: 18092885
 29. Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine*. 2001; 20:385–96. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00359-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00359-0) PMID: 11672901
 30. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012:985646. <https://doi.org/10.1155/2012/985646> PMID: 22235228
 31. Neves JA, Vasconcelos FAG, Machado ML, Recine E, Garcia GS, Medeiros MAT. The Brazilian cash transfer program (Bolsa Família): A tool for reducing inequalities and achieving social rights in Brazil. *Glob Public Health*. 2020; 1–17. <https://doi.org/10.1080/17441692.2020.1850828> PMID: 33253042
 32. Neves PAR, Lourenço BH, Pincelli A, Malta MB, Souza RM, Ferreira MU, et al. High prevalence of gestational night blindness and maternal anemia in a population-based survey of Brazilian Amazonian postpartum women. *PLoS One*. 2019; 14:e0219203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219203> PMID: 31269067
 33. Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines. Weight gain during pregnancy: Reexamining the guidelines. Rasmussen KM, Yaktine AL, editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009.
 34. Lourenço BH, Lima DL, Vivanco E, de Brito Fernandes R, Duarte M, Ribeiro Neves PA, et al. Agreement between antenatal gestational age by ultrasound and clinical records at birth: A prospective cohort in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2020; 15:e0236055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236055> PMID: 32663227
 35. Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC, Olinto MT. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *Int J Epidemiol*. 1997; 26:224–7. <https://doi.org/10.1093/ije/26.1.224> PMID: 9126524
 36. Wei Y, Kehm RD, Goldberg M, Terry MB. Applications for quantile regression in Epidemiology. *Curr Epidemiol Rep*. 2019; 6:191–199. <https://doi.org/10.1007/s40471-019-00204-6>
 37. D'Alessandro U, Ubben D, Hamed K, Ceesay SJ, Okebe J, Taal M, et al. Malaria in infants aged less than six months—is it an area of unmet medical need? *Malar J*. 2012; 11:400. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-400> PMID: 23198986
 38. Mosquera PS, Lourenço BH, Gimeno SGA, Malta MB, Castro MC, Cardoso MA; MINA-Brazil Working Group. Factors affecting exclusive breastfeeding in the first month of life among Amazonian children. *PLoS One*. 2019; 14:e0219801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219801> PMID: 31295320
 39. Cutts JC, Powell R, Agius PA, Beeson JG, Simpson JA, Fowkes FJ. Immunological markers of *Plasmodium vivax* exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2014; 12:150. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0150-1> PMID: 25199532

40. Nicolette VC, Frischmann S, Barbosa S, King CL, Ferreira MU. Naturally acquired binding-inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein and clinical immunity to malaria in rural Amazonians. *J Infect Dis*. 2016; 214:1539–1546. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw407> PMID: 27578850
41. Verhulst NO, Qiu YT, Beijleveld H, Maliepaard C, Knights D, Schulz S, et al. Composition of human skin microbiota affects attractiveness to malaria mosquitoes. *PLoS One*. 2011; 6:e28991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028991> PMID: 22216154
42. Corder RM, Paula GA, Pincelli A, Ferreira MU. Statistical modeling of surveillance data to identify correlates of urban malaria risk: A population-based study in the Amazon Basin. *PLoS One*. 2019; 14:e0220980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220980> PMID: 31398228
43. Moya-Alvarez V, Abellana R, Cot M. Pregnancy-associated malaria and malaria in infants: an old problem with present consequences. *Malar J*. 2014; 13:271. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-271> PMID: 25015559
44. Natama HM, Moncunill G, Rovira-Vallbona E, Sanz H, Sorgho H, Aguilar R, et al. Modulation of innate immune responses at birth by prenatal malaria exposure and association with malaria risk during the first year of life. *BMC Med*. 2018; 16:198. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1187-3> PMID: 30384846
45. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Wamachi A, Ouma JH, Narum DL, et al. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med*. 2009; 6:e1000116. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000116> PMID: 19636353
46. Souza RM, Ataíde R, Dombrowski JG, Ippólito V, Aitken EH, Valle SN, et al. Placental histopathological changes associated with *Plasmodium vivax* infection during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7:e2071. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002071> PMID: 23459254
47. Granado FS, Augusto RA, Muniz PT, Cardoso MA; ACTION Study Team. Anaemia and iron deficiency between 2003 and 2007 in Amazonian children under 2 years of age: trends and associated factors. *Public Health Nutr*. 2013; 16:1751–9. <https://doi.org/10.1017/S1368980012005617> PMID: 23369207
48. Oliveira CS, Sampaio P, Muniz PT, Cardoso MA; ENFAC Working Group. Multiple micronutrients in powder delivered through primary health care reduce iron and vitamin A deficiencies in young Amazonian children. *Public Health Nutr*. 2016; 19:3039–3047. <https://doi.org/10.1017/S1368980016001294> PMID: 27237018
49. Cardoso MA, Scopel KK, Muniz PT, Villamor E, Ferreira MU. Underlying factors associated with anemia in Amazonian children: a population-based, cross-sectional study. *PLoS One*. 2012; 7:e36341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036341> PMID: 22574149
50. Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, Price RN. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2012; 11:135. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-135> PMID: 22540175
51. White NJ, Imwong M. Relapse. *Adv Parasitol* 2012; 80:113–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397900-1.00002-5> PMID: 23199487
52. Thriemer K, Bobogare A, Ley B, Gudo CS, Alam MS, Anstey NM, et al. Quantifying primaquine effectiveness and improving adherence: a round table discussion of the AP MEN Vivax Working Group. *Malar J*. 2018; 17:241. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2380-8> PMID: 29925430
53. Taylor WRJ, Thriemer K, von Seidlein L, Yuentrakul P, Assawariyathipat T, Assefa A, et al. Shortcourse primaquine for the radical cure of *Plasmodium vivax* malaria: a multicentre, randomised, placebo-controlled non-inferiority trial. *Lancet* 2019; 394:929–938. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31285-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31285-1) PMID: 31327563
54. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, et al. "Asymptomatic" malaria: a chronic and debilitating infection that should be treated. *PLoS Med*. 2016; 13:e1001942. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001942> PMID: 26783752
55. Mayor A, Menéndez C, Walker PGT. Targeting pregnant women for malaria surveillance. *Trends Parasitol* 2019; 35:677–686. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.07.005> PMID: 31395496

Prolonged Breastfeeding and the Risk of *Plasmodium vivax* Infection and Clinical Malaria in Early Childhood

A Birth Cohort Study

Anaclara Pincelli¹, * Marly A. Cardoso¹, PhD, † Máira B. Malta¹, PhD, ‡ †
Vanessa C. Nicolete¹, PhD, * Irene S. Soares¹, PhD, § Marcia C. Castro¹, PhD, § ¶
and Marcelo U. Ferreira¹, MD, * ¶ on behalf of the MINA-Brazil Study Working Group

Background: Relatively few Amazonian infants have clinical malaria diagnosed, treated and notified before their first birthday, either because they are little exposed to an infection or remain asymptomatic once infected. Here we measure the proportion of children who have experienced *Plasmodium vivax* infection and malaria by 2 years of age in the main transmission hotspot of Amazonian Brazil.

Methods: We measured IgG antibodies to 3 blood-stage *P. vivax* antigens at the 1- and 2-year follow-up assessment of 435 participants in a population-based birth cohort. Children's malaria case notifications were retrieved from the electronic database of the Ministry of Health. We used multiple Poisson regression models to identify predictors of serologically proven *P. vivax* infection and clinical vivax malaria during the first 2 years of life.

Results: Overall, 23 [5.3%; 95% confidence interval (CI): 3.5–7.8%] children had antibodies to ≥ 2 antigens detected during at least one follow-up assessment, consistent with past *P. vivax* infection(s). Fifteen (3.4%; 95% CI: 2.1–5.6%) children had clinical vivax episodes notified during the first 2 years of life; 7 of them were seronegative. We estimate that half of the infections remained unnotified. Children born to women who experienced *P. vivax* infection during pregnancy were more likely to be infected and develop clinical vivax malaria, while those breast-fed for ≥ 12 months had their risk of being *P. vivax*-seropositive (which we take as evidence of blood-stage *P. vivax* infection during the first 2 years of life) decreased by 79.8% (95% CI: 69.3–86.7%).

Conclusion: *P. vivax* infections in early childhood are underreported in the Amazon, are associated with anemia at 2 years of age, and appear to be partially prevented by prolonged breastfeeding.

Key Words: malaria; *Plasmodium vivax*; breast-feeding; infants; Amazon

(*Pediatr Infect Dis J* 2022;41:793–799)

Plasmodium falciparum causes significant morbidity and mortality in children across sub-Saharan Africa, but neonates and young infants rarely develop clinical disease.¹ Since the mid-1950s, exclusive breastfeeding is known to reduce malaria risk in early childhood.² Additional protective factors are specific maternal antibodies transferred to the fetus, the high content of fetal hemoglobin in host cells and the lower infants' exposure to mosquito vector bites, compared to adolescents and adults.³ Children >6 months of age are often infected and remain at increased risk of severe disease and death over the next years,³ until immunity gradually develops and protects most adolescents and adults from clinical disease.⁴ *Plasmodium vivax*, the second most prevalent human malaria parasite worldwide, remains rare in Central and West Africa, but is increasingly common elsewhere in the tropics and can cause substantial childhood morbidity.⁵ Anemia is particularly common in young children with vivax malaria.⁶

The epidemiology of childhood malaria is understudied in Latin America, where *P. vivax* accounts for >80% of the infections.⁷ Findings from a population-based birth cohort suggest that Amazonian infants rarely develop clinical malaria before the age of 12 months, but older children are as vulnerable to malaria as their mothers.⁸ It remains unclear whether younger infants are less exposed to infection or less susceptible to disease, once infected with malaria parasites.³ To address this knowledge gap, here we use serology to estimate the proportion of cohort participants who experienced blood-stage *P. vivax* infection during their first 2 years of life. Multiple Poisson regression models were built to identify independent correlates of protection from malarial infection and disease.

METHODS

Study Design

The Maternal and Child Health and Nutrition in Acre, Brazil (MINA-Brazil) study is a population-based birth cohort set-up to measure the impact of a range of early exposures on child health and development in the Amazon.⁹ Mother-baby pairs ($n = 1551$) were enrolled in the city of Cruzeiro do Sul (CZS; population, 64,000), Acre State, during pregnancy or at birth. Between July 2015 and June 2016, delivering mothers were interviewed at the Women and Children's Hospital of Juruá Valley—the only maternity hospital

Accepted for publication May 29, 2022

*Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, †Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ‡Graduate Program in Collective Health, Catholic University of Santos, Santos, Brazil, §Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ¶Department of Global Health and Population, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, MA, and ¶Global Health and Tropical Medicine, Institute of Hygiene and Tropical Medicine, Nova University of Lisbon, Lisbon, Portugal

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (407255/2013-3 to M.A.C.); the Maria Cecília Souto Vidigal Foundation (grant to M.C.C.), Brazil; and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil (2016/00270-6 to M.A.C.). We acknowledge scholarships from FAPESP (A.P., 2018/18557-5; M.B.M., 2017/05019-2; and V.C.N., 2020/07020-0), CNPq (M.A.C., M.C.C., I.S.S., and M.U.F.), and Fundação Millennium BCP, Portugal (M.U.F.). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Address for correspondence: Dr. Marcelo U. Ferreira, MD, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. E-mail: muferrrei@usp.br.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website (www.pidj.com).

Copyright © 2022 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.
ISSN: 0891-3668/22/4110-0793

DOI: 10.1097/INF.00000000000003618

of CZS—to obtain sociodemographic, lifestyle, and morbidity information. Birth weight was measured to the nearest 0.5 g, using a Toledo Junior portable scale (Toledo, São Bernardo do Campo, Brazil) with 15 kg capacity. The infant mortality rate in CZS, estimated at 13.8 deaths per 1000 live births in 2017, is higher than the country's average of 12.8 (<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ac/cruzeiro-do-sul.html>). CZS experiences year-round malaria transmission, with an annual malaria index (API; defined as the number of laboratory-confirmed cases per 1000 people per year) of 231.9 in 2016, one of the highest in Brazil.¹⁰ *P. vivax* accounts for approximately 85% of the infections in the study site.

Study Population

Figure 1 shows the study flow chart. Mothers of liveborn children, except for those from hard-to-reach rural communities (n = 305), were invited to bring their children to follow-up assessments at 6–8 months, 1 year, 2 years and 5 years of age.⁹ Here we focus on 435 children who had anti-*P. vivax* antibodies were measured and sociodemographic, morbidity and nutritional information (including infant feeding practices) were updated during assessments at the age of 1 year (mean, 12.7 months; range, 11.1–16.2 months) and 2 years (mean, 23.7 months; range, 16.0–32.1 months). Hemoglobin concentrations were measured during the follow-up visit at the age of 2 years using an ABX Micro 60 cell counter (Horiba, Montpellier, France). Study participants included in the present analysis (65.4% of the 665 children attending both follow-up assessments) had similar perinatal health profiles compared with

children lost to follow-up (n = 581) or lacking blood samples (n = 230). However, the proportions of children from poorest families (lowest quartile; 20.0% vs. 12.5%, $P < 0.001$) and those born to younger (<19 years; 20.5% vs. 14.9%, $P = 0.025$) and less educated (≤ 9 years of schooling; 39.6% vs. 28.5%, $P = 0.001$) mothers and those with inadequate gestational weight gain (34.0% vs. 26.7%, $P = 0.004$) were significantly higher (by χ^2 tests) among nonparticipants, compared to participants. These differences are mostly due to the exclusion from follow-up assessments of children from poorer families living in remote rural sites.

Antibody Measurements

Exposure to *P. vivax* blood stages is known to induce specific IgG antibody responses that can be long-lived even following a low-density asymptomatic infection.^{11–14} We used enzyme immunoassay (ELISA) to detect plasma IgG antibodies to 3 recombinant blood-stage antigens of *P. vivax*: (1) the apical membrane protein (PvAMA1) ectodomain, Brazilian strain, expressed in *Pichia pastoris*¹⁵; (2) the C-terminal, 19-kDa region of merozoite surface protein (MSP) 1 (PvMSP1₁₉), Belém strain, expressed in *Escherichia coli*¹⁶ and (3) the Duffy-binding protein (PvDBP) erythrocyte-binding domain, Salvador-I strain, expressed in *E. coli*.¹⁷ Assays were carried as described with the following solid-phase antigen concentrations: PvAMA1, 1 $\mu\text{g/mL}$; PvMSP1₁₉, 0.025 $\mu\text{g/mL}$ and PvDBP, 0.025 $\mu\text{g/mL}$ (50 $\mu\text{L/well}$).⁸ Reactivity indices (RIs) were calculated as the ratio between the absorbance values of each test sample and a cutoff value for each antigen, corresponding to the

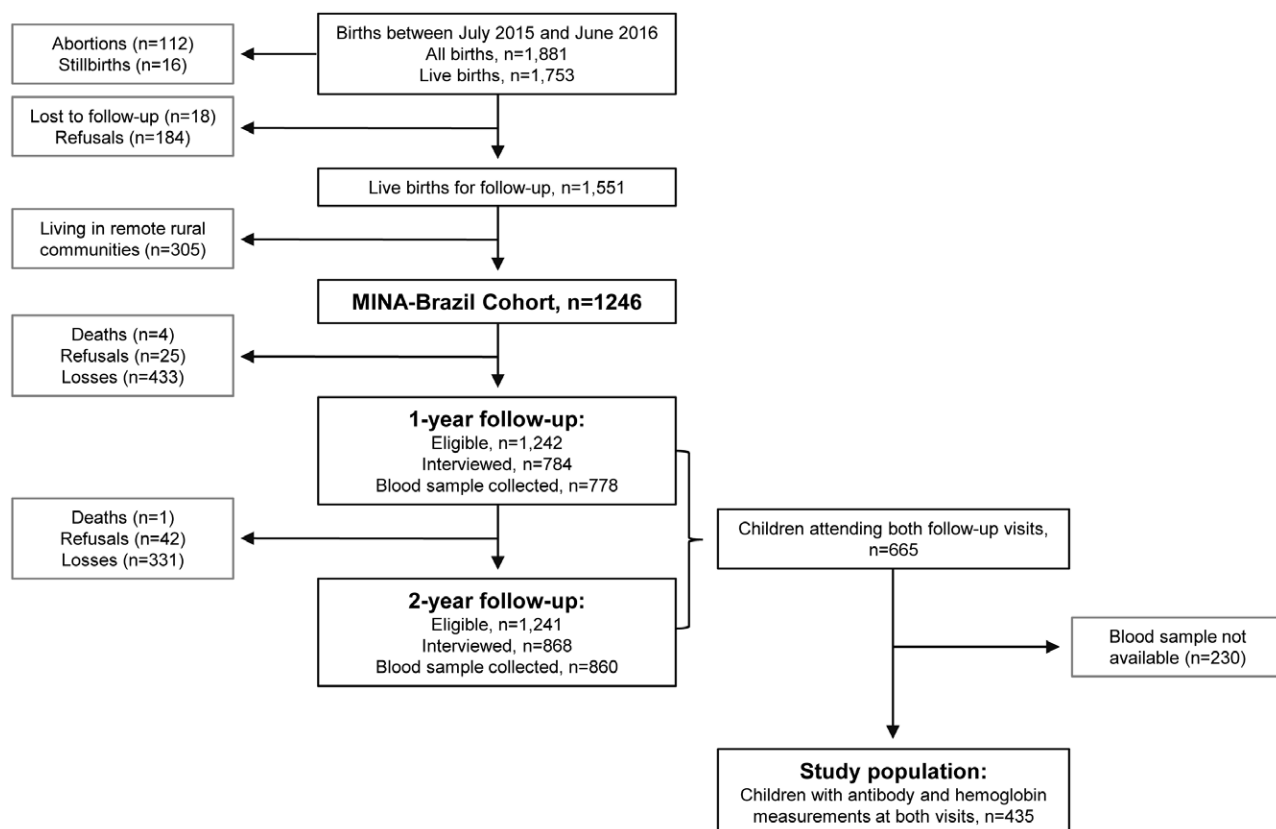


FIGURE 1. Study flowchart. Between July 2015 and June 2016, pregnant women attending antenatal clinics or admitted for delivery to the maternity ward of the Women and Children's Hospital of Jurua Valley in Cruzeiro do Sul, Brazil, were invited to participate. We analyze antibody data obtained during the follow-up visits at 1 and 2 years of age and hemoglobin measurement data obtained during the 2-years visit. Reasons for exclusion and the final number of subjects analyzed for each study outcome are indicated.

average absorbance for plasmas from 42 malaria-naïve donors plus 3 standard deviations. Positive samples had RIs greater than 1. IgG positivity rates among *P. vivax*-infected subjects have been previously estimated at 73% for PvAMA-1,¹⁴ 95% for PvMSP1,¹⁴ and 72% for PvDBP.¹⁸

Outcomes

We considered IgG positivity to ≥ 2 antigens at one or both follow-up assessments as evidence of blood-stage *P. vivax* infection since birth, regardless of any clinical symptoms. Given that maternal IgG antibodies are expected to wane over a period of 6–12 months,¹⁹ we assume that anti-*P. vivax* IgG of maternal origin was undetectable at the time of measurement when children were between 11 and 32 months of age. We additionally used a more relaxed definition of serologically proven *P. vivax* infection (IgG positivity to at least one of the 3 antigens tested) in exploratory analysis. We used vivax malaria case notifications as evidence of clinical malaria episodes experienced by study children. We searched the electronic database of the Ministry of Health of Brazil (SIVEP Malaria)²⁰ for malaria case notifications between July 2015, when the first participants were born, and July 2018, when all study participants had already completed 2 years,⁸ aiming to identify study participants with one or more *P. vivax* malaria episodes diagnosed, treated and notified from birth until the age of 2 years. We retrieved case records that matched study children's name, sex and age, in addition to their mothers' name.⁸ Because malaria is a notifiable disease in Brazil and diagnostic testing and treatment are not available outside government-run health care facilities, as many as 99.6% of laboratory-confirmed malaria episodes across the Amazon are estimated to be routinely entered in the SIVEP Malaria database.²¹ As the vast majority of case notifications refer to infections diagnosed during sick visits, we define them as clinical vivax malaria cases. The secondary outcome, anemia at the 2-year follow-up assessment, was defined by a hemoglobin concentration < 110 g/L (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85839/WHO_NMH_NHD_MNM_11.1_eng.pdf).

Statistical Analysis

Data were analyzed with STATA 15.1 (StataCorp, College Station, TX). Separate multiple Poisson regression models²² were built to identify factors associated with binary (yes/no) outcomes: (1) serologically proven *P. vivax* infection within the first 2 years of age, (2) one or more vivax malaria episodes notified from birth to 2 years of age and (3) anemia diagnosed at 2 years of age. To account for children's clustering into localities with different levels of malaria transmission, as estimated by their API, we used mixed-effects models with API quintile as a contextual covariate and robust variance to analyze malaria-related outcomes. Standard regression models were used to analyze anemia as an outcome. Two critical explanatory variables were prolonged breastfeeding, defined as exclusive or partial breastfeeding lasting for ≥ 12 months,²³ and malaria in pregnancy, defined as one or more infections diagnosed by microscopy during sick visits to health facilities or by real-time PCR at delivery.²⁴ All variables considered in the unadjusted analysis are listed in Figure 1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/INF/E760> and Figures 2, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/INF/E761>. Only variables associated with the outcome at a significance level $< 20\%$ were entered in multiple Poisson regression models. We used a hierarchical approach with distal, intermediate and proximal levels of disease determination²⁵ to select covariates that, in addition to age and wealth index, were retained in downstream analyses because (1) they were associated with the outcome at a significance level of $< 10\%$ or (2) their inclusion in the model changed the risk measures by $\geq 10\%$. Participants with missing values for API ($n = 4$)

were excluded from malaria models; those with missing values in categorical covariates were maintained in the malaria and anemia models by creating a new missing-value category. Adjusted prevalence ratio (PR) estimates are provided along with 95% confidence intervals (CIs) to quantify the influence of each predictor on the outcome while controlling for all other covariates.²² Statistical significance was defined at the 5% level.

Ethics Statement

The study protocol was approved by the institutional review board of the School of Public Health, University of São Paulo (# 872.613, 2014). All mothers or their parents or guardians (if mothers were < 18 years old) provided written informed consent.

RESULTS

Antibody Positivity and Vivax Malaria in Early Childhood

Figure 2 shows the proportions of the 435 children with IgG antibodies to each individual antigen and those who recognized ≥ 2 antigens. Few children—15.6% (95% CI: 12.5–19.4) at 1 year and 13.6% (95% CI: 10.6–17.1) at 2 years—had antibodies detected to at least one antigen. Only 4.4% (95% CI: 2.8–6.8) of the children at 1 year and 2.5% (95% CI: 1.4–4.5) of those at 2 years recognized ≥ 2 antigens. PvAMA1 was recognized by only 0.9% at 1 year and 1.1% at 2 years. Overall, 23 (5.3%; 95% CI: 3.5–7.8) children had antibodies to ≥ 2 antigens detected during at least one follow-up assessment (See Figure, Supplemental Digital Content 3A, <http://links.lww.com/INF/E762>), which we take as evidence of blood-stage *P. vivax* infection during the first 2 years of life. In contrast, only 15 (3.4%; 95% CI: 2.1–5.6%) children had vivax malaria episode(s) retrieved from the case notification database during the same period. Seven children with one or more vivax malaria episodes notified were seronegative at the time of both follow-up assessments. Although we have used a very stringent definition of serologically proven *P. vivax* infection, this outcome was 1.5 times more frequent than clinical vivax malaria. Overall, 6.9% (95% CI: 4.9–9.7%) of children had evidence of *P. vivax* infection—seropositivity to ≥ 2 antigens and/or one or more vivax malaria case notifications—during their first 2 years of life. There were relatively few changes in antibody status between the 1-year and 2-year follow-up assessments (See Figure, Supplemental Digital Content 3B, <http://links.lww.com/INF/E762>). Most seropositive children at the 2-year assessment (7 of 11, 63.6%) had already serological evidence of *P. vivax* infection at the age of 1 year (See Figure, Supplemental Digital Content 3A, <http://links.lww.com/INF/E762>), although very few clinical malaria episodes had been diagnosed in this cohort and notified to the Ministry of Health during the first year of life.⁸

Correlates of *Plasmodium vivax* Infection and Clinical Malaria

We next sought to identify correlates of serologically proven *P. vivax* infection and clinical vivax malaria for 431 participants included in multivariable analysis, which comprised 23 (5.3%) children with antibodies to ≥ 2 antigens detected during at least one follow-up assessment (Table 1) and 15 (3.4%) children with one or more vivax malaria episodes notified during the first 2 years of life (Table 2).

Children born to mothers with one or more *P. vivax* infection diagnosed during pregnancy or at delivery²³ had a significantly increased risk of serologically proven *P. vivax* infection (Table 1) and clinical vivax malaria during their early life (Table 2; see also reference 8), after adjustment for transmission intensity in the children's area of residence (API quintiles). Maternal anemia at

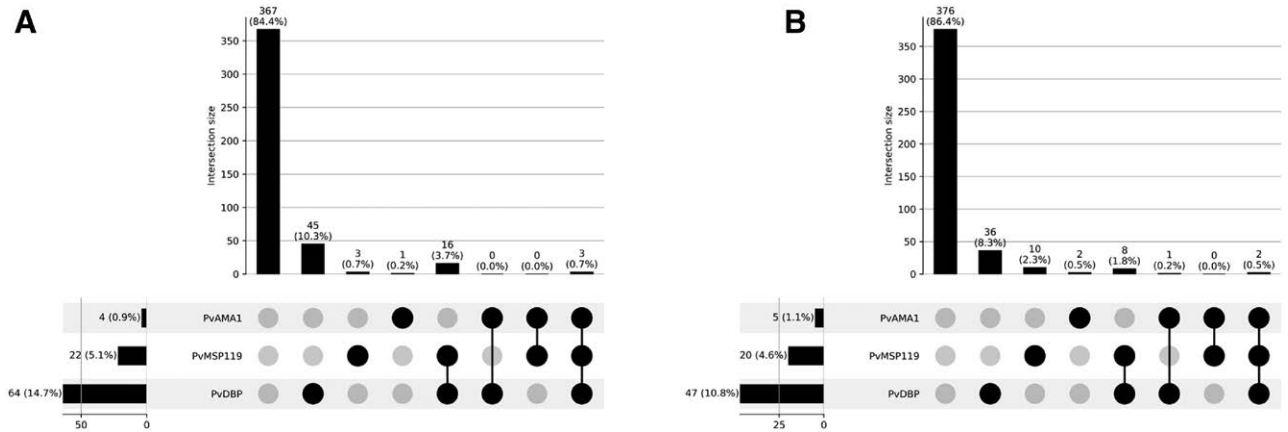


FIGURE 2. Proportions of study participants ($n = 435$) with IgG antibodies to individual *Plasmodium vivax* blood-stage antigens (PvAMA1, PvMSP₁₉, and PvDBP) (black dots) and proportions of those who recognized more than one antigen. A: follow-up visit at 1 year of age; B: follow-up visit at 2 years of age. Gray dots indicate no response.

TABLE 1. Factors Associated with the Presence of IgG Antibodies to ≥ 2 Blood-Stage *P. vivax* Antigens in Amazonian Children at the Age of 1 or 2 Years ($n = 431$)

	n positive/total	Unadjusted			Adjusted		
		PR	95% CI	P	PR	95% CI	P
Child's age (months)		1.124	(0.884–1.428)	0.341	1.139	(0.864–1.501)	0.357
Wealth index quartile							
1st (poorest)	6/93	Ref.			Ref.		
2nd	6/114	0.816	(0.272–2.449)	0.717	1.039	(0.420–2.570)	0.934
3rd	8/113	1.097	(0.394–3.054)	0.859	1.468	(0.496–4.341)	0.488
4th (wealthiest)	3/111	0.419	(0.108–1.632)	0.210	0.452	(0.114–1.786)	0.257
Malaria in pregnancy							
No	19/398	Ref.			Ref.		
Yes	4/33	2.539	(0.916–7.036)	0.073	2.606	(1.268–5.357)	0.009
Breast-feeding duration							
<12 months	15/136	Ref.			Ref.		
≥ 12 months	8/292	0.248	(0.108–0.572)	0.001	0.202	(0.133–0.307)	<0.001
Annual parasite index (API) quintile							
1st (lowest)	5/101	Ref.					
2nd	3/104	0.583	(0.143–2.378)	0.452			
3rd	6/91	1.332	(0.420–4.223)	0.626			
4th	1/83	0.243	(0.029–2.048)	0.193			
5th (highest)	8/52	3.108	(1.069–9.036)	0.037			

CI indicates confidence interval; PR, prevalence ratio.

delivery was a predictor of the risk of clinical malaria in these children (Table 2).

Over two-thirds of the 428 children with complete information (292 or 68.2%) were breastfed for ≥ 12 months (Tables 1 and 2), but the median duration of exclusive breastfeeding was as short as 16 days in this population.²⁶ Interestingly, prolonged breastfeeding appeared to partially protect children from serologically proven early-life *P. vivax* infection (Table 1), although not from clinical vivax malaria using notified episodes as a proxy (Table 2). Similar results were obtained when we repeated the multiple regression analysis using a more relaxed definition of serologically proven *P. vivax* infection (IgG positivity to at least one antigen), as shown in Table, Supplemental Digital Content 4, <http://links.lww.com/INF/E763>.

Plasmodium vivax Infection, Clinical Malaria, and Anemia at 2 Years of Age

All children with antibody and hemoglobin measurements ($n = 435$) were included in multivariable analyses of risk factors

for anemia at 2 years of age. Serologically proven *P. vivax* infections (regardless of symptoms) and clinical vivax malaria episodes (regardless of the antibody status) were both significantly associated with increased anemia risk, after controlling for sex and age (in months), gestational age at birth (in weeks), wealth index (stratified into quintiles), maternal anemia at delivery (yes vs. no), and prolonged (≥ 12 months) breastfeeding (yes vs. no; Fig. 3). We next tested whether clinically silent, unnotified *P. vivax* infections—those retrospectively diagnosed by serology but missing in the case notification database—also contributed to increased anemia risk. No significant association was found (Figure 3).

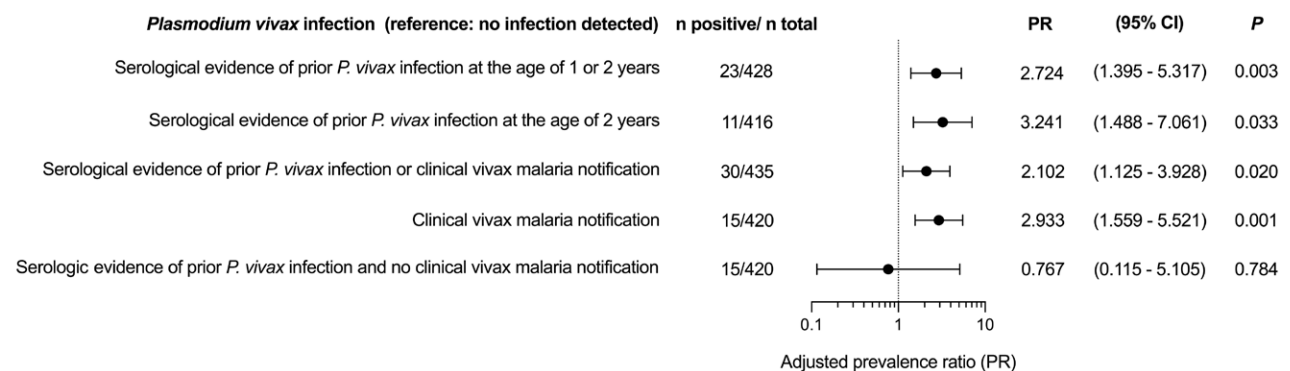
DISCUSSION

We show that young Amazonian children are twice more frequently exposed to *P. vivax* than previously estimated from case notification records from the Ministry of Health of Brazil. Infections retrospectively diagnosed by serology have often failed to elicit a sick visit to a health post, with timely laboratory diagnosis

TABLE 2. Factors Associated with One or More *Plasmodium vivax* Malaria Episodes Notified in Amazonian Children During Their First 2 Years of Life (n = 431)

	n positive/total	Unadjusted			Adjusted		
		PR	95% CI	P	PR	95% CI	P
Child's age (months)		1.120	(0.792–1.583)	0.522	1.220	(0.945–1.573)	0.127
Wealth index quartile							
1st (poorest)	4/93	Ref.			Ref.		
2 nd	6/114	1.224	(0.355–4.214)	0.749	1.449	(0.904–2.322)	0.123
3 rd	4/113	0.823	(0.211–3.207)	0.779	1.407	(0.253–7.834)	0.697
4th (wealthiest)	1/111	0.209	(0.024–1.846)	0.159	0.356	(0.086–1.474)	0.154
Malaria in pregnancy							
No	9/398	Ref.			Ref.		
Yes	6/33	8.040	(3.044–21.235)	<0.001	5.926	(2.159–16.264)	0.001
Maternal anemia at delivery							
No	4/256	Ref.			Ref.		
Yes	11/156	4.513	(1.461–13.943)	0.009	3.451	(1.432–8.318)	0.006
Breast-feeding duration							
< 12 months	3/136	Ref.			Ref.		
≥12 months	12/292	1.864	(0.534–6.508)	0.329	1.325	(0.171–10.266)	0.788
Annual parasite index (API) quintile							
1st (lowest)	1/101	Ref.					
2nd	1/104	0.971	(0.061–15.366)	0.983			
3rd	3/91	3.330	(0.352–31.527)	0.294			
4th	2/83	2.434	(0.224–26.444)	0.465			
5th (highest)	8/52	15.538	(1.992–121.203)	0.009			

CI indicates confidence interval; PR, prevalence ratio.

**FIGURE 3.** Association of anemia at 2 years of age with serologically proven *Plasmodium vivax* infection and clinical vivax malaria notified during the first 2 years of life. Prevalence ratios (PR) indicate the change in anemia risk associated with *P. vivax* infection or disease, compared with children with negative serology and no clinical vivax malaria notification, while controlling for sex and age, wealth index, maternal anemia at delivery, mother's gestational age at birth, and prolonged (≥12 months) breastfeeding. PR estimates for each exposure and their respective 95% confidence intervals (95% CIs) and *P* values were derived from separate multiple Poisson regression models. The total number of study participants in each analysis vary according to the criteria used to define "no infection detected". Accordingly, from the comparison of *P. vivax* infection detected by serology at 1 or 2 years vs. no infection, we excluded 7 children with malaria case notifications who were negative by serology, giving a total of 428. From the comparison of *P. vivax* infection detected by serology at 2 years vs. no infection, we excluded 7 children with malaria case notifications who were negative by serology and 12 children who were seropositive at 1 year but not at 2 years (total analyzed, 416). From the comparison of vivax malaria vs. no infection, we excluded 15 children with positive serology but no malaria case notification (total analyzed, 420). Finally, from the comparison of *P. vivax* infection detected by serology only vs. no infection, we excluded 15 children (8 of them seropositive) with malaria case notifications (total analyzed, 420).

followed by treatment and case notification. These findings imply that active case detection—for example, systematic screening for malaria parasites of infants and young children attending routine care, regardless of any clinical sign and symptom—is required to properly estimate the incidence of childhood infection in this and likely in other similar malaria-endemic settings. The clinical impact of early-life *P. vivax* infections that remain undiagnosed and untreated is unclear in our population. Reassuringly, we found no

association between unnotified infections and the risk of anemia (Fig. 3), a common adverse consequence of vivax malaria in young children.⁶

Breastfeeding protects infants from a broad range of infections—for example, diarrhea, respiratory tract infections, necrotizing enterocolitis, meningitis and otitis media—through the passive transfer of immunoglobulins and other bioactive substances such as cytokines, oligosaccharides, lactoferrin and

lysozyme.²⁷ Whether specific antibodies acquired via breastfeeding play a major protective role against childhood malaria remains undetermined, but breastmilk IgA from malaria-exposed mothers has been shown to significantly inhibit the growth of *P. falciparum* in vitro.²⁸ Moreover, breastmilk components actively regulate the infant's immune system²⁹ and favor healthy microbial colonization of the gut.³⁰ Soluble malaria antigens are shed in breastmilk and may potentially elicit protective immune responses in offspring who are breastfed.³¹ Importantly, protection from infections differs according to dose, duration, and exclusivity of breastfeeding.²⁹

Exclusive (but not necessarily partial) breastfeeding has been suggested to reduce the risk of *P. falciparum* infection in neonates and young infants from the Gambia,² most likely because maternal milk is deficient in para-aminobenzoic acid, which is required for de novo folate synthesis by malaria parasites.^{32,33} More recent evidence that exclusive breastfeeding protects infants from clinical malaria comes from a birth cohort study in Malawi³⁴ and cross-sectional surveys in the Democratic Republic of Congo³⁵ and Cameroon,³⁶ all in Sub-Saharan African settings where *P. falciparum* is the dominant human malaria parasite.

There is much less evidence that partial breastfeeding may protect from malaria well beyond early infancy. Here we show that children who regularly received human breastmilk for ≥ 12 months, regardless of any complementary foods, are less likely to develop antibodies to blood-stage *P. vivax* antigens (Table 1), a proxy of infection. Similarly, current total (partial or exclusive) breastfeeding was associated with a significantly lower risk of *P. falciparum* infection in 6–15 months old HIV-exposed children in Uganda, but not necessarily at the age of 16–24 months.³⁷ Total breastfeeding for ≥ 24 months was also associated with protection from severe falciparum malaria in a case-control study in Mali.³⁸ We have no clear-cut explanation for the fact that, in our study, children breastfed for ≥ 12 months did not differ from other children according to the risk of having a vivax malaria episode during their first 2 years of life (Table 2). Given the infrequency of childhood malaria in our study population, larger studies are needed to examine the association between breastfeeding and the risk of *P. vivax* infection and clinically apparent disease.

The present study has some limitations. First, only 34.9% of the original MINA cohort ($n = 1246$ participants) were eligible for the current analysis (Fig. 1) and children lost to follow-up differed from study participants in some of the key explanatory variables, such as socioeconomic status and place of residence. Second, to minimize the risk of false-positive diagnosis, we applied a strict definition of serologically proven *P. vivax* infection that is admittedly poorly sensitive, as it requires the simultaneous antibody recognition of at least two unrelated blood-stage antigens. Accordingly, only 8 (53.3%) of 15 children with clinical vivax malaria notified during the study period met our criteria of serologically proven infection. Antibody responses to PvAMA1, for example, were particularly infrequent in our study children, consistent with the notion that strong antibody responses to this recombinant antigen may require repeated exposure to *P. vivax* blood stages.^{13,14} We, therefore, have underestimated the burden of *P. vivax* infection. However, the association between prolonged breastfeeding and reduced risk of *P. vivax* infection remained highly significant when we repeated the multiple regression analysis using a less strict definition of past infection (Table 1, Supplemental Digital Content, <http://links.lww.com/INF/E760>). Third, vivax malaria episodes occurring in study children were retrospectively identified, with no blood samples available for further confirmatory diagnostic tests. Although we assume that nearly all clinical malaria episodes confirmed by microscopy and treated in our cohort participants

were retrieved from the notification database,¹⁷ passive surveillance overlooks children with transient or chronic submicroscopic (often asymptomatic) infections who do not seek malaria diagnosis. Despite these potential limitations, the present study provides new insights into the epidemiology of *P. vivax* infection and vivax malaria in young Amazonian children and its relationship with breast-feeding—a topic that merits further exploration in the regional context.

CONCLUSION

Early-life *P. vivax* infections are substantially underreported in the main malaria transmission hotspot of Amazonian Brazil, but are significantly associated with increased risk of anemia at the age of 2 years. Importantly, these infections appear to be partially prevented by prolonged breastfeeding.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all participants in the MINA-Brazil Study and health professionals at the Maternity Hospital, Municipal Health Secretariat, and primary health care units of Cruzeiro do Sul. We acknowledge Dr. Christopher L. King for providing PvDBP recombinant antigen, Dr. Natália S. Ferreira and Dr. Kátia S. Françoise for providing non-endemic control plasmas, and Gabriel Cintra for his technical support.

Investigators of MINA-Brazil Study Group comprise: Alicia Matijasevich, Bárbara H. Lourenço, Jenny Abanto, Maira B. Malta, Marcelo U. Ferreira, Marly A. Cardoso, Paulo Augusto R. Neves, and Suelly G. A. Gimeno (University of São Paulo, São Paulo, Brazil); Ana Alice Damasceno, Bruno P. da Silva, and Rodrigo M. de Souza (Federal University of Acre, Cruzeiro do Sul, Brazil); Simone Ladeia-Andrade (Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil); and Marcia C. Castro (Harvard T. H. Chan School of Public Health, Boston, USA).

REFERENCES

- Maitland K. Management of severe paediatric malaria in resource-limited settings. *BMC Med*. 2015;13:42.
- Gilles HM. The development of Malarial infection in breast-fed Gambian infants. *Ann Trop Med Parasitol*. 1957;51:58–62.
- Dobbs KR, Dent AE. *Plasmodium* malaria and antimalarial antibodies in the first year of life. *Parasitology*. 2016;143:129–138.
- Ashley EA, Poesoprodjo JR. Treatment and prevention of malaria in children. *Lancet Child Adolesc Health*. 2020;4:775–789.
- Beeson JG, Chu CS, Richards JS, et al. *Plasmodium vivax* malaria: challenges in diagnosis, treatment and elimination. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34:529–531.
- Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, et al. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2012;11:135.
- Ferreira MU, Castro MC. Malaria situation in Latin America and the Caribbean: residual and resurgent transmission and challenges for control and elimination. *Methods Mol Biol*. 2019;2013:57–70.
- Pincelli A, Cardoso MA, Malta MB, et al; MINA-Brazil Study Working Group. Low-level *Plasmodium vivax* exposure, maternal antibodies, and anemia in early childhood: population-based birth cohort study in Amazonian Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15:e0009568.
- Cardoso MA, Matijasevich A, Malta MB, et al; MINA-Brazil Study Group. Cohort profile: the Maternal and Child Health and Nutrition in Acre, Brazil, birth cohort study (MINA-Brazil). *BMJ Open*. 2020;10:e034513.
- Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016;15:284.
- Braga EM, Fontes CJ, Krettli AU. Persistence of humoral response against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to *Plasmodium vivax*. *J Infect Dis*. 1998;177:1132–1135.
- Soares IS, da Cunha MG, Silva MN, et al. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of

- Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:357–363.
13. Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, et al. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75:582–587.
 14. Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MC, et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:335–339.
 15. Vicentin EC, Françoiso KS, Rocha MV, et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. *Infect Immun.* 2014;82:1296–1307.
 16. Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine.* 2001;20:385–396.
 17. Singh S, Pandey K, Chattopadhyay R, et al. Biochemical, biophysical, and functional characterization of bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium vivax* duffy-binding protein. *J Biol Chem.* 2001;276:17111–17116.
 18. Cole-Tobian JL, Michon P, Biasor M, et al. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous *Plasmodium vivax* strains in Papua New Guinean children. *Infect Immun.* 2009;77:4009–4017.
 19. Niewiesk S. Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front Immunol.* 2014;5:446.
 20. Baroni L, Pedrosa M, Barcellos C, et al. An integrated dataset of malaria notifications in the Legal Amazon. *BMC Res Notes.* 2020;13:274.
 21. Daher A, Silva JCAL, Stevens A, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* malaria recurrence in Brazil. *Malar J.* 2019;18:18.
 22. Barros AJ, Hirakata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol.* 2003;3:21.
 23. Lackey KA, Fehrenkamp BD, Pace RM, et al. Breastfeeding beyond 12 months: is there evidence for health impacts? *Annu Rev Nutr.* 2021;41:283–308.
 24. Pincelli A, Neves PAR, Lourenço BH, et al. The hidden burden of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy in the amazon: an Observational Study in Northwestern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99:73–83.
 25. Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC, et al. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *Int J Epidemiol.* 1997;26:224–227.
 26. Mosquera PS, Lourenço BH, Gimeno SGA, et al; MINA-Brazil Working Group. Factors affecting exclusive breastfeeding in the first month of life among Amazonian children. *PLoS One.* 2019;14:e0219801.
 27. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: a review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev.* 2015;91:629–635.
 28. Kassim OO, Ako-Anai KA, Torimiro SE, et al. Inhibitory factors in breast-milk, maternal and infant sera against in vitro growth of *Plasmodium falciparum* malaria parasite. *J Trop Pediatr.* 2000;46:92–96.
 29. Young L, McGuire W. Immunologic properties of human milk and clinical implications in the neonatal population. *Neoreviews.* 2020;21:e809–e816.
 30. Laursen MF. Gut microbiota development: influence of diet from infancy to toddlerhood. *Ann Nutr Metab.* 2021;77(suppl 3):21–34.
 31. van den Elsen LWJ, Verhasselt V, Egwang T. Malaria antigen shedding in the breast milk of mothers from a region with endemic malaria. *JAMA Pediatr.* 2020;174:297–298.
 32. Hawking F. Milk diet, *p*-aminobenzoic acid, and malaria (*P. berghei*); preliminary communication. *Br Med J.* 1953;1:1201–1202.
 33. Parra M, Yang J, Weitner M, et al. Neonatal mice resist *Plasmodium yoelii* infection until exposed to para-aminobenzoic acid containing diet after weaning. *Sci Rep.* 2021;11:90.
 34. Kalanda BF, Verhoeff FH, Brabin BJ. Breast and complementary feeding practices in relation to morbidity and growth in Malawian infants. *Eur J Clin Nutr.* 2006;60:401–407.
 35. Brazeau NF, Tabala M, Kiketa L, et al. Exclusive breastfeeding and clinical malaria risk in 6-month-old infants: a Cross-Sectional Study from Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95:827–830.
 36. Asoba GN, Sumbele IUN, Anchang-Kimbi JK, et al. Influence of infant feeding practices on the occurrence of malnutrition, malaria and anaemia in children ≤5 years in the Mount Cameroon area: a cross sectional study. *PLoS One.* 2019;14:e0219386.
 37. Vora N, Homsy J, Kakuru A, et al. Breastfeeding and the risk of malaria in children born to HIV-infected and uninfected mothers in rural Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;55:253–261.
 38. Safeukui-Noubissi I, Ranque S, Poudiougou B, et al. Risk factors for severe malaria in Bamako, Mali: a matched case-control study. *Microbes Infect.* 2004;6:572–578.