

## MALÁRIA HUMANA: PADRONIZAÇÃO E OPTIMIZAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO INDIVIDUAL E INQUÉRITOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS

Antonio Walter FERREIRA (1, 2) & Maria Carmen Arroyo SANCHEZ (1)

---

### RESUMO

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) é considerado teste de referência na sorologia da malária. Neste trabalho procuramos otimizar o teste empregando **P. falciparum** obtido de sangue humano e de cultura e **P. vivax** obtido de sangue de paciente como antígenos, para pesquisa de anticorpos IgG e IgM. Das variáveis técnicas estudadas melhores resultados foram obtidos quando os soros foram diluídos em PBS contendo 1% de Tween 80 e as lâminas contendo a suspensão antigênica foram estabilizadas em dessecadores ou fixadas com acetona. Foi também padronizado o teste imunoenzimático ELISA com antígenos de **P. falciparum** obtidos em cultura. O estudo comparativo com o teste de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG mostrou: a) nos pacientes primo infectados por **P. falciparum** a sensibilidade para ambos os testes foi de 71%; b) nos pacientes primo infectados pelo **P. vivax** a sensibilidade foi de 40% para ambos os testes; c) nos pacientes não primo infectados e com malária atual pelo **P. falciparum** a sensibilidade para ambos os testes foi de 100%; d) nos pacientes não primo infectados e com malária atual pelo **P. vivax** a sensibilidade foi de 85% para o teste ELISA e de 92% para a IFI; e) nos pacientes com malária mista a sensibilidade para ambos os testes foi de 100%. A especificidade da IFI foi de 100% e do teste ELISA 95% nos casos de indivíduos não maláricos.

Os resultados obtidos sugerem ser o teste ELISA, uma boa alternativa para o teste de IFI, para a pesquisa de anticorpos IgG anti **P. falciparum**, na sorologia da malária.

**UNITERMOS:** Malária; IFI; Teste imunoenzimático ELISA.

---

### INTRODUÇÃO

A malária continua sendo a doença de maior prevalência no mundo, principalmente nas regiões tropicais onde permanece hiper ou holoendêmica. Estima-se em 300 milhões de ca-

---

(1) Laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

(2) Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

**Endereço para correspondência:** Dr. Antonio Walter Ferreira. Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470. CEP 05403 São Paulo, SP, Brasil.

tos por ano, com cerca de 3 milhões de óbitos, principalmente entre crianças. No Brasil, representa um dos mais sérios problemas de saúde pública tendo sido notificados pela SUCAM a ocorrência de mais de 500.000 casos em 1987. Além da alta prevalência nas áreas endêmicas, a doença assume características importantes nas áreas já erradicadas devido ao intenso fluxo migratório existente e, casos de malária têm sido relatados principalmente, a malária pós-transfusional. É obrigatório a introdução de rígidas medidas de controle, quer no campo social, quer no campo operacional. Classicamente as técnicas de campo para avaliação epidemiológica na qual as decisões operacionais são baseadas, constituem no exame de sangue e baço, na detecção de casos febris e na identificação de parasitas em gotas de sangue.

O exame parasitológico, normalmente, é feito em indivíduos que apresentam febre. Porém nem todos os indivíduos com malária tem febre ou raramente dão importância aos sintomas que apresentam<sup>17, 33</sup>. Um exame parasitológico positivo indica apenas a prevalência de ponto<sup>13, 46</sup>. Para se ter uma idéia de prevalência de período associa-se o exame parasitológico ao índice esplênico, que é inespecífico<sup>19</sup>. Um exame parasitológico negativo nem sempre é exclusivo de malária, pois falsos resultados negativos podem ocorrer quando existe baixa parasitemia, ação de drogas anti-maláricas ou nos indivíduos semi-ímmunes<sup>4, 14, 19, 21, 26, 27, 33</sup>. Os testes sorológicos contribuem de maneira decisiva no diagnóstico individual ou em estudos soroepidemiológicos em áreas endêmicas ou não endêmicas.

Nas áreas onde a malária é endêmica ou já foi erradicada os testes sorológicos são úteis para: medir o nível de endemicidade, verificar a presença ou ausência de transmissão, delinear áreas malarígenas, detectar mudanças sazonais de transmissão, investigar a reintrodução de novos casos, e avaliar os programas anti-maláricos<sup>1, 2, 4, 5, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 28</sup>. Nas áreas onde a doença não é endêmica são úteis na seleção de doadores de sangue, no diagnóstico diferencial e no diagnóstico de indivíduos com baixa parasitemia<sup>1, 2, 4, 5 e 15</sup>.

Segundo a Organização Mundial da Saúde<sup>29</sup>, os métodos sorológicos, além de apresentarem boa sensibilidade, especificidade, devem servir, também para identificar as espécies infectantes, para diferenciar as infecções atuais

das progressas, bem como a primo infecção das reinfecções, e para determinar o estado de imunidade do hospedeiro. Assim é que muitos estudos vêm sendo realizados a fim de desenvolver e aperfeiçoar testes sorológicos práticos e seguros e que satisfaçam a algum daqueles requisitos.

No presente trabalho, padronizamos e otimizamos o teste de imunofluorescência indireta para a pesquisa de anticorpos IgG e IgM, o teste imunoenzimático, ELISA para antígenos plasmodiais e comparamos os testes para a pesquisa de anticorpos IgG anti *P. falciparum* e anti *P. vivax* em soros de pacientes primo infectados, de pacientes com mais de uma malária, de pacientes com infecção mista e de indivíduos não maláricos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Antígenos** — *Plasmodium falciparum* foi obtido a partir do cultivo "in vitro"<sup>16, 39, 40, 41</sup> e de sangue de pacientes primo infectados, não tratados com infecção recente. *Plasmodium vivax* foi obtido a partir de sangue de pacientes primo infectados não tratados com infecção recente.

**Soros** — Para padrão positivo foi selecionado um painel de soros com títulos altos e baixos obtidos a partir de pacientes com infecção atual pelo *P. vivax* ou *P. falciparum* confirmada pelo exame parasitológico. Para padrão negativo foi selecionado um painel de soros não reagentes obtidos a partir de indivíduos não infectados, clínica e parasitologicamente diagnosticados.

Para aplicação dos testes foram selecionados soros de indivíduos de área endêmica, primo infectados pelo *P. vivax* ou *P. falciparum* de pacientes com mais de uma malária, de pacientes com infecção atual mista por *P. falciparum* e *P. vivax*, soros de indivíduos não maláricos e soros de bancos de sangue. Para estudo da especificidade do teste foram selecionados soros de indivíduos com outras parasitoses.

**Conjugados** — Os conjugados fluorescentes foram produzidos a partir da fração IgG de soro de carneiro anti IgG humano, específico para cadeias  $\gamma$  e da fração IgG de soro de carneiro anti IgM humano específico para cadeia  $\mu$ , purificado por gel filtração em Sephadex G200 ou por troca iônica. Foi utilizada a técnica de conjugação de Clark e Sheppard<sup>7</sup> es-

tabelecendo-se entre 2,5 e 3,0 a relação fluoresceína-proteína. Para produção dos conjugados enzimáticos foi utilizada a técnica de Nakane, 1978<sup>28</sup>. Como enzima foi utilizada a peroxidase (Horseradish Peroxidase Type VI — Sigma Chem. Co.) e estabeleceu-se entre 0,5 e 1,0 a relação enzima-proteína. Ambos conjugados, fluorescentes e enzimáticos, foram titulados por titulação em bloco para se estabelecer a diluição ótima de uso.

**Teste de imunofluorescência indireta** — Após a determinação do número de hemácias parasitadas por campo, o sedimento foi lavado e suspenso em solução salina tamponada com fosfato (PBS) de acordo com a fórmula:  $VD = (2,5 \times N) - 1$ , onde VD é o volume do diluente que deve ser adicionado sobre a papa de hemácias e N é o número de hemácias parasitadas por campo microscópico. As lâminas contendo a suspensão antigênica (5  $\mu$ l por área determinada) foram armazenadas em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  após serem acondicionadas em embalagens plásticas, isentas de umidade. Como variáveis foram estudados: lise das hemácias com água destilada, à temperatura ambiente por 10 minutos; fixação em acetona por 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ ; lise das hemácias e fixação em acetona e, estabilização em dessecador após retirada do freezer, por 20 minutos a temperatura ambiente. Como diluente dos soros foram utilizados PBS e PBS contendo Tween-80 a 1% (PBS-T).

**Teste imunoenzimático com antígenos plasmodiais** — Placas plásticas de fundo plano (NUNC) foram sensibilizadas com 100  $\mu$ l de antígeno plasmodial, obtido a partir de cultura, após concentração com plasmagel quando a parasitemia era menor que 5%, lise das hemácias e extração dos componentes antigênicos com uréia 8M<sup>12</sup>, na concentração de 5  $\mu$ l/ml (método de Warbung-Christian), previamente alcalinizado com tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9.6 por 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  e 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após lavagens com PBS-T por três vezes as placas foram bloqueadas com solução a 1% soro albumina bovina (BSA) em tampão carbonato por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após novo ciclo de lavagens foram adicionados 100  $\mu$ l dos soros padrão positivo e padrão negativo diluídos em PBS contendo BSA a 1%. Após incubação por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  e novo ciclo de lavagens foi adicionado 100  $\mu$ l de conjugado enzimático diluído segundo o título, em PBS-T. Após nova incubação por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  e novo ciclo de lavagens a reação enzimática foi relevada pela adi-

ção de ortofenilenodiamina em tampão citrato pH 5,0 contendo água oxigenada. Após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e na ausência de claridade a reação enzimática foi interrompida pela adição de HCl 2M. A leitura da placa foi feita em aparelho Minireader a 492 nm.

O teste imunoenzimático padronizado foi aplicado para soros de indivíduos primo infectados por *P. falciparum* ou *P. vivax*, para indivíduos com infecções mistas e para indivíduos não maláricos. Para esse estudo os soros foram diluídos a 1/100 ou a 1/50 e 1/100. O título em anticorpos do soro foi calculado pelas fórmulas:

$$T = \text{Log D} + \frac{\text{Log DOD} - \text{Log DOC.O.}}{K}$$

para uma diluição do soro e

$$T = \text{Log D1} + \frac{(\text{Log DOD1} - \text{Log DOC.O.})(\text{Log D2} - \text{Log D1})}{\text{Log DOD1} - \text{Log DOD2}}$$

para duas diluições do soro

$$K = \frac{\Delta \text{Log DOD}}{\Delta \text{Log D}} \quad \begin{array}{l} \text{D, D1 e D2 — diluições} \\ \text{de soro} \\ \text{DO = densidade ópti-} \\ \text{ca obtida} \end{array}$$

O “cut off” do teste foi determinado pela fórmula:

$$\text{C.O.} = \bar{X} + 2\text{SD}$$

a partir de 20 soros negativos, onde

$\bar{X}$  = média aritmética dos soros não reagentes e  
SD = desvio padrão obtido

## RESULTADOS

As médias geométricas dos títulos de 10 soros reagentes no teste de imunofluorescência indireta com antígenos de *P. falciparum* obtidos a partir de cultura e conjugados anti IgG e anti IgM e a partir de pacientes primo infectados e conjugados anti IgG estão expressas na tabela 1.

Também são apresentados os resultados obtidos nas diferentes variáveis técnicas estudadas.

TABELA 1

Média geométrica dos títulos de 10 soros reagentes no teste de imunofluorescência indireta com antígenos de *P. falciparum*, de cultura e de sangue de pacientes primo infectados, frente a diferentes variáveis técnicas.

Variável técnica		Antígeno de cultura		Antígeno de sangue humano
Diluições do soro	PBS - Tween 80	Conjugados		Conjugados anti IgG
		anti IgG	anti IgM	
		A	64,98	
B	452,55	519,84	139,29	
C	64,98	16,24	21,44	
D	685,93	452,55	196,98	
PBS		A	14,14	SNR
		B	121,26	28,28
		C	16,24	SNR
		D	259,92	56,57
				45,95

Variáveis técnicas A — lise das hemácias com água destilada; B — fixação das lâminas com acetona; C — lise das hemácias e fixação com acetona e D — estabilização no dessecador.

SNR — todos os soros foram não reagentes.

Conforme indicado na tabela 1 os antígenos obtidos a partir de cultura forneceram maior reatividade do que os antígenos obtidos de sangue humano para a pesquisa de anticorpos IgG. Das variáveis técnicas estudadas melhores resultados foram obtidos quando as lâminas foram fixadas em acetona ou quando sensibilizadas em dessecador com soros diluídos em PBS contendo 1% de Tween 80. Além da maior reatividade dos soros positivos, os soros não reagentes e de outras parasitoses não apresentaram nenhuma coloração de fundo que pudesse atrapalhar a interpretação dos resultados, fato observado quando os antígenos foram obtidos a partir de sangue de pacientes primo infectados.

As médias geométricas dos títulos de 10 soros reagentes no teste de imunofluorescência indireta com antígenos de *P. vivax* obtidos a partir de sangue de pacientes primo infectados e conjugados anti-IgG e anti-IgM bem como as variáveis técnicas estudadas, estão expressas na tabela 2.

Os dados apresentados na Tabela 2 mostram a maior reatividade, dos antígenos fixados em acetona ou estabilizados a temperatura ambiente em dessecador, quando diluídos em PBS contendo 1% Tween-80.

TABELA 2

Médias geométricas dos títulos de 10 soros reagentes no teste de imunofluorescência indireta com antígenos de *P. vivax* obtidos de pacientes primo infectados frente a diferentes variáveis técnicas.

Variável técnica			Antígeno de sangue humano	
Diluições dos soros	PBS - Tween - 80	A B C D	Conjugado	
			Anti-IgG	Anti-IgM
			260	SNR
1114	279			
121	12			
1810	320			
PBS		A	SNR	SNR
		B	640	34
		C	13	SNR
		D	597	49

Variável técnica A — lise com hemácias com água destilada; B — fixação da lâmina com acetona; C — lise das hemácias e fixação com acetona e D — estabilização no dessecador.

SNR — todos os soros foram não reagentes.

A figura 1 mostra os resultados obtidos na padronização do teste ELISA. Das condições ensaiadas melhores resultados foram obtidos quando a concentração de antígenos foi fixada

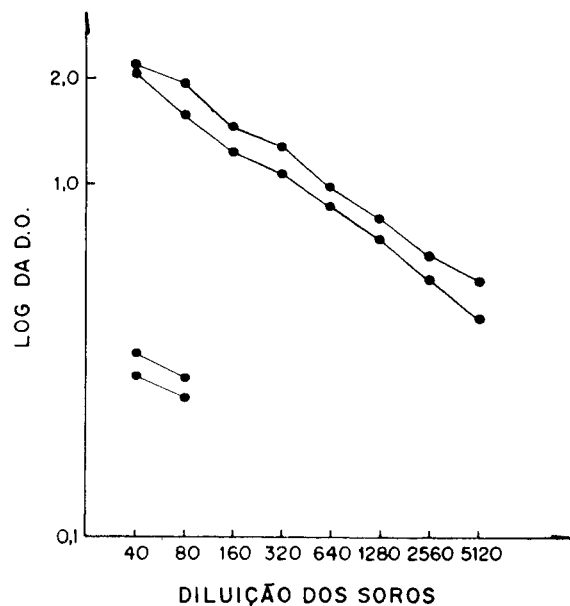


Fig. 1 — Curvas dose-resposta de soros padrão positivos e padrão negativos, obtidos no teste ELISA, para pesquisa de anticorpos IgG anti-*P. falciparum*.

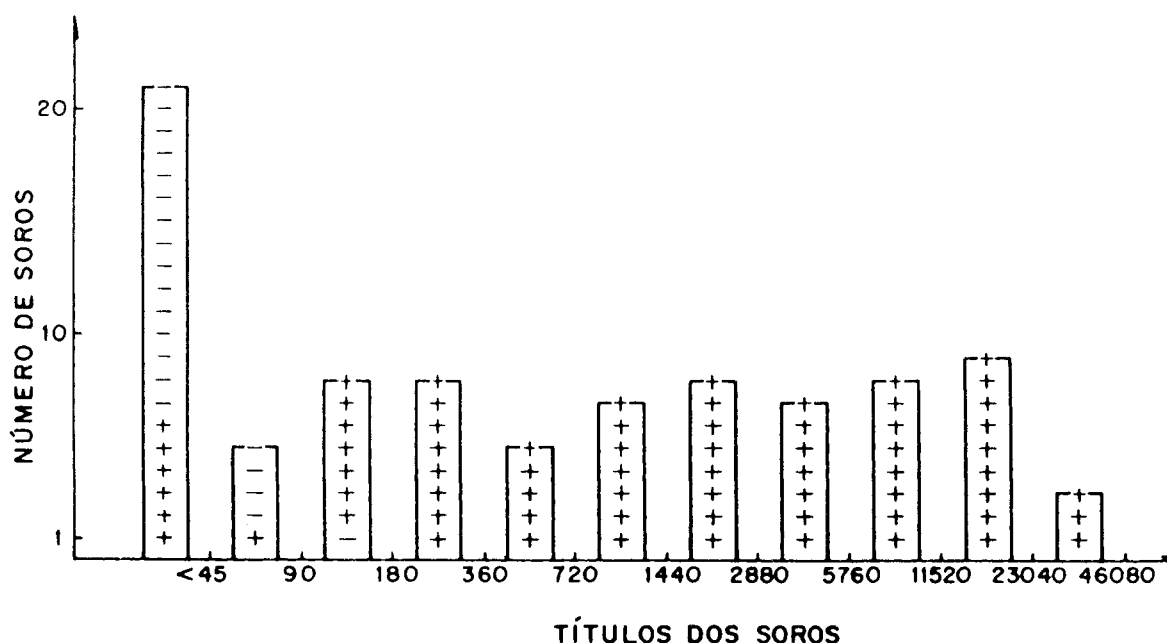


Fig. 2 — Curva de distribuição de títulos em anticorpos IgG anti *F. falciparum* no teste ELISA obtida a partir de uma única diluição dos soros.

em 5 µg/ml e as diluições do conjunto em 1/10.000. Nestas condições obtivemos uma linearidade entre o log das densidades ópticas e as diluições dos soros.

A figura 2 mostra a curva de distribuição de títulos dos soros estudados, estabelecendo como "cut off" o título igual a 90. Como podemos observar dos 20 soros de indivíduos não maláricos, apenas 1 soro apresentou título 118 sendo considerado reagente. Dos sete soros de pacientes com malária que apresentaram títulos inferiores a 90 no teste ELISA, três eram de pacientes primo infectados pelo *P. vivax*, dois eram de pacientes primo infectados pelo *P. falciparum* e dois de pacientes não primo infectados com infecção atual pelo *P. vivax*.

O estudo comparativo do teste ELISA, com componentes antigênicos de *P. falciparum* e IFI com antígenos de *P. falciparum* (IFI-Pf) e *P. vivax* (IFI-Pv) está apresentado nas tabelas 3, 4, 5, 6 e 7. Para os pacientes primo infectados, tabela 3, pelo *P. falciparum*, 2 soros foram negativos no teste ELISA, embora também fossem negativos na IFI-Pf. Nos pacientes primo infectados pelo *P. vivax* o teste ELISA foi negativo em 3 dos cinco casos estudados. O mesmo resultado foi obtido no teste IFI-Pf.

Nos pacientes com mais de uma malária, tabela 4, o teste ELISA e a IFI-Pf foram positivos em todos os casos quando a infecção atual era pelo *P. falciparum*. Quando a infecção atual era pelo *P. vivax* foram observados 2 soros negativos

TABELA 3

Resultados do teste imunoenzimático, ELISA e do teste de imunofluorescência indireta com antígeno do *P. falciparum* (IFI-Pf) e *P. vivax* (IFI-Pv) na titulação de anticorpos IgG em soros de pacientes primo infectados pelo *P. falciparum* (7 casos) e *P. vivax* (5 casos).

Primo infecção					
<i>P. falciparum</i>			<i>P. vivax</i>		
ELISA	IFI-Pf	IFI-Pv	ELISA	IFI-Pf	IFI-Pv
29441	5120	160	261	20	1280
8485	1280	80	9	SNR	40
1045	160	SNR	3030	160	160
562	20	SNR	1	SNR	SNR
187	80	SNR	1	SNR	SNR
37	SNR	SNR	—	—	—
17	SNR	SNR	—	—	—

SNR = Soro não reagente  
"Cut off" = 90

pelo teste ELISA e apenas 1 soro negativo na IFI-Pf. Nos indivíduos com infecção mista, tabela 5, não houve diferença na reatividade do teste ELISA e IFI-Pf. O teste ELISA apresentou um falso resultado positivo nos indivíduos não maláricos, fato não observado no teste IFI-Pf, embora alguns casos tenham apresentado dificuldade na leitura microscópica. As médias geométricas dos títulos dos soros apresentados

TABELA 4

Resultados do teste imunoenzimático-ELISA e do teste de imunofluorescência indireta com antígenos de *P. falciparum* (IFI-Pf) ou *P. vivax* (IFI-Pv) na titulação de anticorpos IgG, em soros de pacientes com mais de uma malária e com episódio atual de malária-falciparum (34 casos) ou malária-vivax (13 casos).

Infecção Atual					
<i>P. falciparum</i>			<i>P. vivax</i>		
ELISA	IFI-Pf	IFI-Pv	ELISA	IFI-Pf	IFI-Pv
2457	640	SNR	871	1280	160
1319	640	SNR	993	320	2560
565	640	SNR	319	320	10240
10907	1280	SNR	1767	20	1280
176	320	SNR	118	80	10240
655	1280	SNR	187	320	20480
5765	40000	160	30	20	10240
18647	2560	320	455	80	40
2164	2560	80	46	SNR	20
18647	5120	320	4201	160	160
18647	2560	160	5519	320	640
10000	5120	640	261	640	1280
13247	10240	20	3171	1280	640
759	2560	320	--	--	--
5967	1280	40	--	--	--
1188	640	40	--	--	--
3467	5120	40	--	--	--
30932	5120	320	--	--	--
1880	640	160	--	--	--
30932	2560	320	--	--	--
339	640	80	--	--	--
1584	10240	320	--	--	--
2522	320	40	--	--	--
91	20	2560	--	--	--
322	640	2560	--	--	--
161	320	2560	--	--	--
165	40	320	--	--	--
8323	1280	1280	--	--	--
108	40	40	--	--	--
3885	640	640	--	--	--
8088	640	640	--	--	--
623	640	1280	--	--	--
1960	640	320	--	--	--
18647	2560	1280	--	--	--

SNR = Soro não reagente  
"Cut off" = 90

TABELA 5

Resultados do teste imunoenzimático (ELISA) e do teste de imunofluorescência indireta com antígeno de *P. falciparum* (IFI-Pf) ou *P. vivax* (IFI-Pv) na titulação de anticorpos IgG em soros de pacientes com infecção mista *P. falciparum* ou *P. vivax* (9 casos) ou de indivíduos não maláricos (20 casos).

Infecção Mista			Não Maláricos		
ELISA	IFI-Pf	IFI-Pv	ELISA	IFI-Pf	IFI-Pv
1894	2560	SNR	4	SNR	SNR
10123	1280	80	25	SNR	SNR
14299	20480	80	32	SNR	SNR
15910	10240	80	18	SNR	SNR
281	2560	640	18	SNR	SNR
12702	10240	160	26	SNR	SNR
4169	2560	40	18	SNR	SNR
1239	640	640	11	SNR	SNR
18647	2560	1280	2	SNR	SNR
--	--	--	13	SNR	SNR
--	--	--	13	SNR	SNR
--	--	--	11	SNR	SNR
--	--	--	16	SNR	SNR
--	--	--	9	SNR	SNR
--	--	--	22	SNR	SNR
--	--	--	118	SNR	SNR
--	--	--	83	SNR	SNR
--	--	--	46	SNR	SNR
--	--	--	57	SNR	SNR
--	--	--	77	SNR	SNR

SNR = Soro não reagente  
"Cut off" = 90

na tabela 6, mostram ser o teste ELISA mais reativo que a IFI-Pf, fato não observado em relação a IFI-Pv quando a infecção atual era pelo *P. vivax*. A tabela 7 mostra os índices de sensibilidade obtidos nos diferentes soros testados.

## DISCUSSÃO

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) é o teste de referência na sorologia da malária humana<sup>5, 10, 11, 22, 23, 25, 30, 31, 38</sup>. Porém embora venha sendo empregado na rotina de vários laboratórios, as condições técnicas no preparo dos reagentes e na execução do teste são muito variáveis, sendo difícil estabelecer uma comparação satisfatória entre diferentes laboratórios, o que inviabiliza uma discussão clara sobre os resultados obtidos. Em relação à diluição do antígeno que deve ser colocado nas áreas delimitadas das lâminas, a maioria das

TABELA 6

Médias geométricas dos títulos de anticorpos IgG, obtidos pelos testes imunoensaio ELISA e imunofluorescência indireta com antígenos de *P. falciparum* (IFI-Pf) e *P. vivax* (IFI-Pv) em pacientes com malária e em indivíduos não maláricos.

Casuística	ELISA	IFI-Pf	IFI-Pv
Primo infectados <i>P. falciparum</i>	560	108	20
<i>P. vivax</i>	23	20	61
Não primo infectado com infecção atual pelo <i>P. falciparum</i>	2244	1065	147
<i>P. vivax</i>	502	106	980
Mista	4855	3484	137
Não maláricos	20	SNR	SNR

SNR = Soro não reagente

técnicas descritas na literatura preconiza os métodos por tentativas. Com base nos trabalhos descritos por LÓPEZ-ANTUÑANO<sup>18</sup> e SULZER em 1969 foi feita a padronização da diluição ótima de antígenos de *P. falciparum* e de *P. vivax*. A fórmula final para diluição da papa de hemácias  $VD = (2.5 \times N) - 1$ , onde VD é o volume do diluente necessário para ressuspender uma parte da papa de hemácias e N é o número médio de hemácias parasitadas com esquizontes por campo microscópico, fornece um parâmetro importante na padronização do teste. Deve-se considerar como ideal a diluição que fornece

cerca de 20 hemácias parasitadas por campo microscópico com objetiva 40x. Determinada a diluição ótima do antígeno, foram estudadas diferentes variáveis técnicas para se obter um máximo de sensibilidade e especificidade na IFI. Na otimização do teste de imunofluorescência indireta com antígenos de *P. falciparum* para pesquisa de anticorpos IgG e IgM, empregando-se o teste "t" de Student, para amostras pareadas, verificou-se não haver diferença estatística significativa entre as técnicas de fixação das lâminas em acetona e de estabilização das lâminas em dessecador, quando os soros foram diluídos em PBS contendo 1% de Tween-80. Esta observação foi válida tanto para a pesquisa de anticorpos IgG, com antígenos de cultura ( $t = 1.5$ ;  $GL = 9$ ;  $\alpha = 5\%$ ) ou com antígenos obtidos a partir de sangue de pacientes primo infectados ( $t = 2.3$ ;  $GL = 9$ ;  $\alpha = 5\%$ ), como na pesquisa de anticorpos IgM ( $t = 1.0$ ;  $GL = 9$ ;  $\alpha = 5\%$ ), com antígenos de cultura. Houve diferença significativa entre as técnicas de estabilização das lâminas em dessecador, com soros diluídos em PBS contendo 1% de Tween-80 e as demais técnicas estudadas. Não foram pesquisados anticorpos IgM com antígenos de *P. falciparum* obtidos a partir de sangue de pacientes pois a presença de anticorpos prejudica o antígeno e falsos resultados positivos ou negativos foram observados<sup>6, 34</sup>. Para o preparo do antígeno de *P. vivax* a dificuldade maior relaciona-se com a obtenção de sangue humano. É necessário que o paciente seja primo infectado, com alta parasitemia (+ + +) e que não tenha sido

TABELA 7

Sensibilidade do teste imunoenzimático ELISA com antígenos de *P. falciparum* e do teste de imunofluorescência indireta com antígenos de *P. falciparum* (IFI-Pf) e *P. vivax* (IFI-Pv) para pesquisa de anticorpos IgG com limite de confiança de 95% de probabilidade, em pacientes com diferentes formas de malária.

Casuística	ELISA	IFI-Pf	IFI-Pv
Primo infectados <i>P. falciparum</i>	71% (29,0 - 96,3)	71% (29,0 - 96,3)	29% (38 - 71)
<i>P. vivax</i>	40% (5,3 - 85,3)	40% (5,3 - 85,3)	60% (14,6 - 95)
Não primo infectados com infecção atual pelo <i>P. falciparum</i>	100% (89,8 - 100,0)	100% (89,8 - 100,0)	82% (65,5 - 93,2)
<i>P. vivax</i>	85% (54,5 - 98,0)	92% (63,9 - 99,8)	100% (75,3 - 100,0)
Mista	100% (66,4 - 100,0)	100% (66,4 - 100,0)	89% (15,7 - 99,7)

tratado. O ideal seria a obtenção de antígenos do sangue de macacos *Saimiri seireus*, experimentalmente infectados<sup>9, 32</sup>. Na otimização do teste de imunofluorescência indireta os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos com antígenos de *P. falciparum*. Pela análise estatística do teste "t" de Student, para amostras pareadas, não houve diferença estatística significativa entre as técnicas de fixação das hemácias em acetona e de estabilização em dessecador quando, os soros foram diluídos em PBS contendo 1% de Tween-80 para a pesquisa de anticorpos IgM ( $t = 1.5$ ; GL = 9;  $\alpha = 5\%$ ). Para a pesquisa de anticorpos IgG já houve diferença estatística significativa ( $t = 3.2$ ; GL = 9;  $\alpha = 5\%$ ). Em relação as demais técnicas sempre houve diferenças significativas. O teste de imunofluorescência indireta otimizado para pesquisa de anticorpos anti *P. falciparum* forneceu excelentes resultados quando aplicado em população de área endêmica ou na seleção de doadores em bancos de sangue de áreas não endêmicas. As condições mencionadas neste trabalho permitirão que laboratórios de menor porte possam introduzir em sua rotina o teste de imunofluorescência indireta com resultados confiáveis.

Com relação à obtenção e preparação de componentes antigênicos de *P. falciparum* a partir de cultura, procurou-se selecionar culturas com parasitemia elevada e formas em esquizontes<sup>35</sup>. Com parasitemias inferiores a 5% foi feita a concentração das hemácias parasitadas em Plasmagel. A utilização do Plasmagel além de ser mais simples forneceu resultados superiores aos obtidos em gradientes coloidais. Com parasitemias superiores a 5% não foi necessária a prévia concentração das hemácias parasitadas. Em relação à extração dos componentes antigênicos do *P. falciparum* melhores resultados foram obtidos quando ao PBS foi adicionada uréia 8M. O antígeno assim obtido foi estável, podendo ser armazenado em geladeira a 4°C por várias semanas. O teste imunoenzimático padronizado seguiu a metodologia descrita inicialmente por VOILLER em 1974<sup>35</sup> e modificado por diferentes pesquisadores<sup>3, 32, 35, 36, 37, 42, 43, 44</sup>.

Para aplicação do teste imunoenzimático foi inicialmente determinada a curva dose-resposta frente a soros padrão positivos e negativos. Observando-se uma linearidade constante entre as diluições dos soros e o logaritmo da densidade óptica obtidas, pode-se empregar fórmulas que permitiram quantificar com pre-

cisão os títulos dos soros a partir de uma ou duas diluições. A curva de distribuição dos títulos de soros de indivíduos com malária por *P. falciparum* ou *P. vivax* e de indivíduos não maláricos mostrou que sete soros de pacientes primo infectados foram não reagentes no teste ELISA embora apresentassem exame parasitológico positivo. Destes, 3 casos eram primo infectados pelo *P. vivax* e 2 pelo *P. falciparum*, o que está de acordo com os dados referidos na literatura<sup>12, 24</sup>.

O estudo comparativo do teste ELISA, e IFI com antígenos de *P. falciparum* (IFI-Pf) e *P. vivax* (IFI-Pv) para pesquisa de anticorpos IgG, revelou que para soros de indivíduos primo infectados ambos os testes apresentavam falsos resultados negativos e que a sensibilidade foi sempre menor para o sistema heterólogo. Para soros de pacientes não primo infectados com malária atual pelo *P. falciparum* ou mista a sensibilidade para ambos os testes, ELISA e IFI-Pf foi de 100%, fato observado apenas para IFI-Pv quando os pacientes apresentavam infecção atual pelo *P. vivax*. Também foi observado que a média geométrica dos títulos foram sempre superiores com os sistemas homólogos.

Com relação à especificidade, observou-se um soro falso positivo no teste ELISA.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem ser o teste ELISA uma boa alternativa para substituir o teste de imunofluorescência indireta, quando não se dispõe de microscópio de fluorescência. O que limita, no momento, a utilização do teste ELISA, em larga escala, é a obtenção de antígenos e a qualidade dos suportes inertes, além de necessitar de melhor avaliação nos pacientes primo infectados.

## SUMMARY

### Human malaria: standardization of serologic tests for individual diagnostic and seroepidemiologic surveys

The indirect immunofluorescence antibody test (IFA) is normally employed as reference test in the serology of malaria. In this report we standardized and optimized the test, for our condition, utilizing *P. falciparum* obtained from human blood on culture and *P. vivax* obtained from human blood as antigens, for detection of IgG and IgM antibodies. Some technical variables, were tested and best results



were obtained when sera were diluted in PBS containing 1% Tween-80 and the slides, containing the antigenic preparation were fixed in cold acetone or stabilized on dried air with silica. The ELISA test was standardized for *P. falciparum* antibodies and the comparison of the IFA and ELISA showed: a) in *P. falciparum* prime infected patient the sensitivity was 71% for both tests; b) in *P. vivax* prime infected patients the sensitivity was 40% for both tests; c) in non prime infected patients with *P. falciparum* malaria the sensitivity was 100% for both tests; d) in non prime infected patients with *P. vivax* malaria the sensitivity was 85% for ELISA and 92% for IFA; e) in patients with *P. vivax* and *P. falciparum* malaria the sensitivity was 100% for both tests. The specificity was 95% for ELISA and 100% for IFA in non malaria individuals.

The results showed that the ELISA test could be an alternative for IFA for IgG antibodies in the serology of malaria.

#### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq — Projeto do Polonoroeste — Processo n.º 70.0350/85 pelo suporte financeiro.

Ao Laboratório de Malária da SUCEN pelo fornecimento de cultura de *P. falciparum* no início do trabalho e pelo fornecimento de soros de pacientes com malária.

A Vera de Paula Quartier de Oliveira, Rivaldo de Souza Cardoso e Paulo de Oliveira pela assistência técnica na execução do projeto.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMBROISE-THOMAS, P. — Diagnosis and seroepidemiologic studies of malaria by immunofluorescence, and indirect haemagglutination and immunoenzymology. *Israel J. med. Sci.*, 14: 690-691, 1978.
2. AMBROISE-THOMAS, P. — L'immunofluorescence dans la serologie du paludisme. *WHO/MAL*, (953): 1-6, 1981.
3. AMBROISE-THOMAS, P.; BILLIAULT, X.; DES-GEORGES, P.T. & BOUTTAZ, M. — Mise en évidence, par une micromethode immuno-enzymologique (ELISA), d'antigenes metaboliques produits "in vitro" par *Plasmodium falciparum* en culture. *WHO/MAL*, (930): 1-5, 1981.
4. BEAUDOIN, R.L.; RAMSEY, J.M. & PACHECO, N.D. — Antigens employed in immunodiagnostic tests for the detection of malarial antibodies. *WHO/MAL*, (952): 1-11, 1981.
5. BIDWELL, D.E. & VOLLER, A. — Malaria diagnosis by enzyme-linked immunosorbent assays. *Brit. med. J.*, 282: 1747-8, 1981.
6. BROWN, G.V.; STACE, J.D. & ANDERS, R.F. — Specificities of antibodies boosted by acute *Plasmodium falciparum* infection in man. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 32: 1221-1228, 1983.
7. CLARK, H.F. & SHEPPARD, C.C. — A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. *Virology*, 20: 642-644, 1963.
8. COLLINS, W.E.; LUNDE, M.N. & SKINNER, J.C. — Development of antibodies to *P. vivax* as measured by two different techniques. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 24: 412-416, 1975.
9. COLLINS, W.E. & SKINNER, J.C. — The indirect fluorescent antibody test for malaria. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 21: 690-695, 1972.
10. DRUILHE, P. & MONJOUR, L. — Sérodiagnostic du paludisme par immuno-précipitation. Valeur comparée de différentes techniques d'extraction des antigenes solubles. Sensibilité par rapport à l'immunofluorescence indirecte. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 169: 1089-1095, 1975.
11. FRANCIS, V.S.; GUPTA, M.M. & BHAT, P. — Evaluation of a crude soluble antigen from "in vitro" culture of *Plasmodium falciparum* for ELISA. *Tropenmed. Parasit.*, 33: 240-242, 1982.
12. FRANCO, E.L.F. — Immunoserology of malaria. Apostila. Julho de 1984. 22p.
13. GUPTA, M.M.; SEBASTIAN, M.J.; BHAT, P. & LOBEL, H.O. — Evaluation of "in vitro" cultured *P. falciparum* as antigen for malaria serology. *J. trop. Med. Hyg.*, 84: 165-170, 1981.
14. JENSEN, J.B. — Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 27: 1274-1276, 1978.
15. JENSEN, J.B. & TRAGER, W. — Some recent advances in the cultivation of *Plasmodium falciparum*. *Israel J. med. Sci.*, 14: 563-570, 1978.
16. KREIER, J.P. — The isolation and fractionation of malaria-infected cells. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 55: 317-331, 1977.
17. LOBEL, H.O. — Indications for and usefulness of serological techniques in epidemiological investigation and assessment. *WHO/MAL*, (967): 1-11, 1981.
18. LÓPEZ-ANTUÑANO, F.J. — Falciparum malaria antigen slides for indirect immuno-fluorescence test made from "in vitro" cultures. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 68: 257, 1974.
19. LÓPEZ-ANTUÑANO, F.J. — Estadarización de las pruebas de Inmuno-Fluorescencia Indirecta (IFI) para malaria. *PAHO/WHO* Interoffice Memorandum, 1984.
20. LUNDE, M.N. & POWERS, K.G. — The preparation of malaria haemagglutination antigen. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 70: 283-291, 1976.
21. MANAWADU, B.R. & VOLLER, A. — Standardization of the indirect fluorescence antibody test for malaria. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 72: 456-462, 1978.
22. NAKANE, P.K. & KAWAOI, A. — Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 1084-1091, 1974.
23. PASVOL, G.; WILSON, R.J.M.; SMALLEY, M.E. &

- BROWN, J. — Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 72: 87-88, 1978.
24. QUAKYI, I.A. — The development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for malaria. *Tropenmed. Parasit.*, 31: 325-333, 1980.
25. QUILICI, M.; DELMONT, J.; RANQUE, J.; ROUGEMONT, A.; MARTARESCHE, B. & BOISSON, M.E. — Évaluation de l'antigène de *Plasmodium falciparum* d'origine humaine pour la réaction d'immunofluorescence indirecte dans le paludisme. *Bull. Soc. Path. exot.*, 68: 515-521, 1975.
26. REESE, R.T.; LANGRETH, S.G. & TRAGER, W. — Isolation of stages of the human parasite *Plasmodium falciparum* from culture and from animal blood. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 57 (suppl. 1): 53-61, 1979.
27. REPORT on the Merieux Foundation/WHO Meeting on Immunological methods in malariology. *WHO/MAL*, (948): 1-17, 1981.
28. ROFFI, J.; LAFABRIE, B. & STACH, J.L. — Utilisation d'antigènes purifiés pour le sérodiagnostic et les études épidémiologiques du paludisme humain. Intérêt de la technique ELISA pour la mise en évidence des IgG et des IgM spécifiques. *Bull. Soc. Path. exot.*, 76: 49-68, 1983.
29. SAUL, A.; MYLER, P.; ELLIOTT, T.; T. & KIDSON, C. — Purification of mature schizonts of *P. falciparum* on colloidal silica gradients. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 60: 755-759, 1982.
30. SPENCER, H.C.; COLLINS, W.E.; CHIN, W. & SKINNER, J.C. — The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for malaria. I. The use of in vitro-cultured *P. falciparum* as antigen. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 28: 927-938, 1979.
31. SPENCER, H.C.; COLLINS, W.E. & SKINNER, J.C. — The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for malaria. II. Comparison with the malaria indirect fluorescent antibody test (IFA). *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 28: 933-936, 1979.
32. SPENCER, H.C.; COLLINS, W.E.; WARREN, M.; JEFFERY, G.M.; MASON, J.; HUONG, A.Y.; STANFILL, P.S. & SKINNER, J.C. — The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for malaria. III. Antibody response in documented *P. falciparum* infections. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 30: 747-750, 1981.
33. SULZER, A.J.; WILSON, M. & HALL, E.C. — Indirect fluorescent antibody tests for parasitic diseases. V. An evaluation of a thick-smear antigen in the IFA test for malaria antibodies. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 18: 199-205, 1969.
34. TANDOM, A.; SAXENA, R.P.; BHATIA, B. & SAXENA, K.C. — The enzyme-linked immunosorbent assay in the immunodiagnosis of human malaria. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 76: 371-372, 1982.
35. TARGETT, G.A.T. — Antibody response to *Plasmodium falciparum* malaria: comparison of immunoglobulin concentration antibody titers and antigenicity of different asexual stages of the parasite. *Clin. exp. Immunol.*, 7: 501-517, 1970.
36. TRAGER, W. — *Plasmodium falciparum* in culture: improved continuous flow method. *J. Protozool.*, 26: 125-129, 1979.
37. TRAGER, W. — Recent developments in enlarging the scale of production of *Plasmodium falciparum* "in vitro". *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 57 (suppl. 1): 85-86, 1979.
38. TRAGER, W. & JENSEN, J.B. — Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673-675, 1976.
39. VOLLER, A.; BARTLETT, A. & BIDWELL, D.E. — Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 70: 98-106, 1976.
40. VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. & EDWARDS, R. — A comparison of isotopic and enzyme immunoassays for tropical parasitic diseases. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 71: 431-437, 1977.
41. VOLLER, A.; BIDWELL, D.; HULT, G. & ENGVALL, E. — A microplate of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 51: 209-211, 1974.
42. VOLLER, A.; CORNILLE-BROGGER, R.; STOREY, J. & MOLINEAUX, L. — A longitudinal study of *P. falciparum* malaria in the West African savanna using the ELISA technique. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 58: 429-438, 1980.
43. VOLLER, A.; HOLDT, G.; THORS, C. & ENGVALL, E. — New serological test for malaria antibodies. *Brit. med. J.*, 1: 61, 1975.
44. WILLET, G.P. & CANFIELD, C.J. — *Plasmodium falciparum*: continuous cultivation of erythrocyte stages in plasma-free culture medium. *WHO/MAL*, (1002): 1-8, 1983.
45. WILSON, R.J.M. & LING, I. — Fractionation and characterization of *Plasmodium falciparum* antigens. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 57 (suppl. 1): 123-133, 1979.
46. ZUCKERMAN, A. — Current status of the immunology of blood and tissue Protozoa. II. *Plasmodium*. *Exp. Parasit.*, 42: 374-446, 1977.