

EL INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA) EN EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE *Plasmodium vivax*

Hilda A. PEREZ & Mercedes DE LA ROSA

RESUMEN

Comunicamos nuestra experiencia con la aplicación del inmunoensayo enzimático al diagnóstico serológico de *Plasmodium vivax* con antígeno homólogo. Este se obtuvo a partir de una muestra de sangre de un paciente y luego de lisar los glóbulos rojos con detergente (NP-40). En un "pool" conformado con 11 sueros de pacientes con malaria por *P. vivax* se encontraron anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA. Se introdujo además la proteína A como sonda secundaria para determinar la respuesta anti-*P. vivax* en una muestra de 30 sueros de pacientes con un primer episodio palúdico. Se encontró un 93% de correlación con el diagnóstico parasitológico y la prueba resultó específica y reproducible.

UNITERMOS: Malaria; *P. vivax*; Anticuerpos; ELISA.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela la malaria es causada por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*. Esporádicamente se informa de casos de *Plasmodium malariae*; el mayor número de casos es causado por *P. vivax*, de allí que se le considera el principal agente etiológico de la malaria en nuestro país.

Venezuela fue sede de uno de los programas de erradicación de la malaria más exitosos del área tropical^{11, 12}. Sin embargo, por razones de índole social, técnicas, fiscales y administrativas⁹ el país enfrenta en la actualidad un peligroso incremento de la morbilidad malarica y entre otras medidas se hace imperioso mejorar la cobertura diagnóstica. Convencionalmente el diagnóstico de la malaria se asienta en el examen microscópico de las muestras hemáticas. Se

trata de un procedimiento específico (visualización de los parásitos) y sensible (10-20 parásitos/ μ l de sangre para la gota gruesa), pero de baja cobertura cuando se requiere el examen oportuno de un gran número de muestras. Los estudios realizados en varios laboratorios indican que la serología puede servir a la vigilancia epidemiológica de la malaria²³, sobre todo con métodos como el inmunoensayo enzimático o ELISA que además de permitir el examen masivo de las muestras, produce resultados cuantificables y sólo requiere de mínimas cantidades de reactivos^{22, 23}. Vale decir que en lo concerniente al diagnóstico serológico de la malaria, la mayor experiencia se tiene con *P. falciparum*, quizá por la relativa facilidad con que puede obtenerse antígeno a partir de sangre de pacientes o de cultivos con altas parasitemias en contrapo-

sición a las bajas parasitemias de la infección natural y dificultades técnicas para el cultivo que son características de *P. vivax*.

En este trabajo, comunicamos nuestra experiencia con el diagnóstico serológico de *P. vivax* mediante la prueba de ELISA.

MATERIALES Y METODOS

Antígeno — Se extrajeron 10 ml de sangre venosa recogidas en anticoagulante (CPD), de un paciente que asistía a la consulta de Malariología en Edo. Bolívar. El paciente tenía una parasitemia de 2% para el momento de la toma de muestra, constituida principalmente por trofozoítos jóvenes y medianos. La sangre se lavó tres veces por centrifugación en medio RPMI-1640 (GIBCO, USA) y se removió la capa de granulocitos. Los eritrocitos se suspendieron en una solución crioprotectora (glicerol: sorbitol 4,2% en RPMI-1640; 7:18), se repartieron en alícuotas de 0,5 ml en viales para criopreservación y se congelaron en nitrógeno líquido.

Para preparar el antígeno se siguió, básicamente el procedimiento descrito por MAKEY, MCGREGOR, PAOUNOVA & LAMBERT (1982)¹⁵. Se descongeló 1 ml de la suspensión tras sumergir dos viales en agua calentada a 37°C y los eritrocitos se lavaron una vez con NaCl 0,3 M; luego se mezclaron v:v con Nonidet P40 (NP-40) al 1% (v:v) en NaCl 0,15 M. Esta mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 1 minuto y seguidamente se agregaron 5 volúmenes de solución salina fosfatada 0,15 M, pH 7,3 (PBS) suplementada con 1% (v:v) de Tween 20 (PBS/T). Luego se centrifugó a 200 xg/10 min/4°C y se descartó el sedimento (células enteras, principalmente); la fase sobrenadante se centrifugó a 6.000 xg/10 min/4°C y el sedimento obtenido se lavó 4 veces con PBS y se sonicó en un volumen de PBS no mayor de 1/2 del volumen original de eritrocitos y se guardó a -70°C; una alícuota sirvió para determinar la concentración de proteína contra una curva de referencia obtenida con albúmina sérica de bovino, ASB⁶.

Sueros — Se obtuvieron 5 ml de sangre venosa de 24 pacientes con diagnóstico parasitológico de *P. vivax* y de otros 7 positivos para *P. falciparum*. Todos del sexo masculino, de edades

comprendidas entre 20 y 46 años. Estos pacientes referían un primer ataque de paludismo, pero habían residido en las zonas mineras del Estado Bolívar por períodos comprendidos entre 6 y 12 meses y tomado tratamiento preventivo irregularmente. Se excluyeron las infecciones mixtas. Seis sueros de pacientes diagnosticados en un brote de *P. vivax* ocurrido en el Edo. Nueva Esparta fueron cedidos gentilmente por la Lic. Edelmira Mora (Servicio de Endemias Rurales, Maracay).

Ensayo — La ELISA descrita por VOLLER et al., (1974)²². Se utilizaron placas de poliestireno (Costar, USA) y la adsorción del antígeno se realizó a pH 9,6 en carbonato de sodio 0,1 M. Cincuenta microlitros de la dilución de antígeno fueron agregados en cada micropozo y tras incubar toda la noche en cuarto frío (4°C), la placa se lavó una vez con NaCl 0,15 M suplementado con Tween 20 al 0,1% (v:v) [NaCl/T] y los sitios no saturados por el antígeno se bloquearon con ASB al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar 3 veces con NaCl/T las placas se invirtieron sobre papel absorbente para remover el remanente de solución de lavado, se colocaron individualmente en bolsas plásticas con auto-cierre y se guardaron a -20°C, hasta por 4 meses sin pérdida de la actividad del antígeno.

Al momento de usarlas, las placas se retiraron del congelador y luego de 10 min a temperatura ambiente se lavaron una vez con PBS/T. Se agregaron entonces 50 μ l de la dilución de suero inmune o control en PBS/T. Concluido el período de incubación con el suero inmune, se realizaron tres ciclos de lavado con NaCl/T y se agregó entonces la dilución de conjugado en ASB 1% en PBS/T. Los conjugados empleados fueron anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA (obtenidos en conejos) y Proteína A, todos acoplados a peroxidasa (SIGMA IMMUNOCHEMICALS, USA). El cromógeno ABTS [2,2-azino-bis-3-ethyl-benziazoline sulfonic acid (Sigma)] sirvió de indicador de la reacción con H₂O₂¹ que fue inhibida con azida de sodio al 0,1% en ácido cítrico 0,1 M. La absorbancia se determinó a 405 nm en un lector Titertek I.

RESULTADOS

Previamente se establecieron las condiciones óptimas del ensayo en cuanto a las dilucio-

nes de antígeno, de los sueros y conjugados utilizados y los tiempos de incubación correspondientes. Sirvieron de referencia un "pool" de once sueros positivos por IFI y de otros tantos negativos cuidadosamente seleccionados según los antecedentes parasitológicos, epidemiológicos e inmunológicos de los donantes. En estos sueros se encontraron anticuerpos anti-*P. vivax* de las clases IgG, IgM e IgA. Los valores de ELISA obtenidos con los conjugados utilizados siguieron el orden $IgM \geq Proteína A \geq IgG \geq IgA$. Tabla 1. Para todas las pruebas referidas en este ensayo el antígeno se diluyó 1:400 (1 μ g proteína/pozo), los períodos de incubación tanto para los sueros como para los conjugados fueron de 2 h a 37°C. Todos estos parámetros deben ser establecidos para cada lote de antígeno.

TABLA 1

Respuesta de anticuerpos IgM, IgG e IgA en un "pool" de sueros de pacientes con malaria por *Plasmodium vivax*

Sueros	IgM	IgG	IgA	Prot. A
"Pool"* positivo	1,103	0,569	0,491	0,679
"Pool" negativo	0,310	0,234	0,283	0,294

* Cada uno de 11 sueros. Todos los ensayos con una dilución 1:200 del "pool" correspondiente. Valores de ELISA determinados a 405 nm.

Como en este trabajo se utilizó un antígeno crudo extraído de glóbulos rojos infectados con *P. vivax* mediante tratamiento con NP-40, procedimos a determinar la especificidad del ensayo. Los sueros positivos y negativos mencionados anteriormente se ensayaron contra un antígeno placebo preparado con glóbulos rojos no infectados y utilizado en una dilución equivalente (1 μ g proteína/pozo) a aquella empleada con el antígeno obtenido de *P. vivax*. En el "pool" de sueros positivos se pudo determinar una respuesta anti-glóbulos rojos sanos, tipo IgM, muy significativa en comparación con el control negativo (0,62 vs 0,22). En contraste, la reactividad contra antígenos de la célula hospedera, medida con Proteína A no fue significativamente mayor que la del grupo control (0,29 vs 0,23). La absorción del "Pool" positivo con glóbulos rojos no infectados disminuyó hasta un 35% la respuesta de IgM contra el antígeno de *P. vivax*.

Tomando en consideración la información ya mencionada se prefirió el conjugado de Proteína A para evaluar un lote de 30 sueros de pacientes con paludismo por *P. vivax*. Previamente se estableció el valor negativo de referencia con un lote de 45 sueros de sujetos sin antecedentes palúdicos ni de residencia en zona de transmisión. Ocho de estos sueros fueron de personal del laboratorio y el resto fue proporcionado por el Banco Municipal de Sangre de Caracas. Cuando estos sueros se enfrentaron (Dil 1/200) con el antígeno de *P. vivax* se obtuvo un valor de referencia estimado en 0,294 a partir del valor medio + 4DEM. Dicho valor sirvió de guía para establecer las lecturas significativas (95% límite de confianza) en 30 sueros de pacientes con paludismo por *P. vivax* diagnosticados parasitológicamente. Todos ellos sin antecedentes previos de haber padecido malaria. Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 2. Se consideraron positivos todos los sueros con valores de ELISA $\geq 0,294$. Se pudo determinar que el ensayo con Proteína A resultó positivo en 93% de la muestra examinada.

El título de anticuerpos séricos anti-*P. vivax* determinado en 25 pacientes estuvo en el orden de 1:400 para un 70% de los sueros y excepcionalmente fue $\geq 1:1.200$, Tabla 3.

Como dato interesante se registró el título de anticuerpos, antes y después de la terapia medicamentosa en un paciente, casualmente un antropólogo de nuestro instituto, quien contrajo paludismo por *P. vivax* durante una expedición al Amazonas. Este paciente no volvió a zona endémica después del tratamiento radical para *P. vivax*. Se observó un claro descenso del título de anticuerpos de 1:1.200 para el momento del diagnóstico hasta 1:200 a los 7 meses siguientes.

Además de los sueros de pacientes con *P. vivax* se quiso documentar la respuesta de 7 sueros de pacientes con paludismo por *P. falciparum* diagnosticados parasitológicamente; los pacientes estaban en fase aguda para el momento de la toma de muestra y no tenían antecedentes previos de malaria. Los resultados presentados en la Tabla 4 indicaron una respuesta significativa de los sueros de *P. falciparum* frente al antígeno de *P. vivax*.

TABLA 2

Valores de ELISA anti-*Plasmodium vivax* medidos con Proteína A-peroxidasa en sueros de pacientes con un primer episodio palúdico.

Paciente	Absorbancia a 405 nm
VR	0,310
812-23	0,326
812-12	0,315
812-4	0,408
040-I-LR +	0,344
022-2NR +	0,296 (N.S)
043-1JG +	0,308
043-2EF +	0,273 (N.S)
020-1GR +	0,373
017-2 +	0,320
812-13	0,336
P.E.	0,592
812-38	0,460
S.Z	0,670
P.G	0,653
E.R	0,440
19-2	0,398
E.R.R	0,814
0-231	0,373
812-33	0,558
812-15	0,393
L.I	0,478
J.E	0,574
J.D.L	0,480
M.G	0,472
E.M.L	0,450
S.V	1,700
M.G	0,759
R.S	0,670
M.A.R	0,576

+ Pacientes de un brote ocurrido en el Edo. Nueva Esparta, el resto infectados en del Edo. Bolívar. Todos los sueros ensayados con una dilución 1:200. Valores significativos $\geq 0,294$ determinados en un lote de 45 sueros controles.

N.S = No significativo

DISCUSION

El diagnóstico serológico de *P. vivax* ha sido acometido con antígenos de *P. falciparum* y *Plasmodium knowlesi*²⁰, pero se ha referido una baja correlación entre el diagnóstico serológico

TABLA 3

Distribución porcentual de los títulos de anticuerpos anti-*Plasmodium vivax* determinados en 25 sueros de pacientes con malaria por *P. vivax**.

Título **	% de los sueros examinados
$\geq 1:200$	15
$\geq 1:400$	70
$\geq 1: 1.200$	15

* 25 pacientes diagnosticados parasitológicamente y seropositivos para *P. vivax* en el ensayo de muestreo.

** Inverso de la máxima dilución de suero con un valor significativo de ELISA (405 nm) con Proteína A-peroxidasa.

TABLA 4

Respuesta de los sueros de pacientes con paludismo por *Plasmodium falciparum* frente al antígeno de *Plasmodium vivax*.

Suero	Valor de ELISA ^(405nm)
812-2	0,688
812-3	0,719
812-5	0,413
812-7	0,369
812-8	0,326
812-20	0,396
812-22	0,487

Valores determinados con Proteína A-peroxidasa

y el parasitológico¹⁷. Algunos autores han informado de la poca confiabilidad que merecen los antígenos de las especies de *Plasmodium* mencionadas, para determinar anticuerpos anti-*P. vivax*²⁰. Hace poco BARNWELL (1986)³ produjo un panel de anticuerpos monoclonales contra *P. vivax* y encontró sólo un 42% de reactividad con *P. knowlesi*, 50% con *P. cynomolgy* y ninguna con *P. falciparum*.

El trabajo que presentamos acá es uno de los pocos intentos de estudiar la respuesta sérica a la malaria por *P. vivax* con antígenos homólogos mediante la prueba de ELISA. Queremos

destacar la aplicación exitosa del conjugado de proteína A como sonda secundaria, que sepamos no se le había utilizado antes para el serodiagnóstico de *P. vivax*, aunque sí para *P. falciparum* con resultados exitosos². Obviamente, la sonda de proteína A ofrece muchas ventajas sobre los conjugados convencionales^{16, 18}. Sin embargo, tiene poca o ninguna afinidad con la IgG3¹⁴ de la cual se ha dicho constituye una proporción importante de los anticuerpos anti-*P. falciparum*²⁴ y aun por determinar en el caso de *P. vivax*.

La presencia de anticuerpos IgM contra componentes de la célula hospedera introduce un fuerte componente inespecífico en el ensayo de IgM contra antígenos parasitarios de la fase eritrocítica, a menos que se introduzcan antígenos purificados o producidos mediante la síntesis orgánica de los epitopos relevantes⁵. El hallazgo de IgM contra componentes del glóbulo rojo se ha citado frecuentemente en el estudio de la malaria humana⁴, probablemente tiene que ver con las profundas modificaciones del citoesqueleto del eritrocito que ocurren durante el desarrollo de la fase eritrocítica del parásito¹⁹ y se le ha atribuido cierto papel en la patología de la enfermedad, principalmente en la anemia que manifiestan los pacientes con *P. falciparum*²⁵.

Encontramos un descenso significativo en la respuesta de anticuerpos a los 7 meses siguientes a la curación medicamentosa. Aunque se trata de un solo paciente, consideramos que la observación es interesante porque fue posible excluir de manera confiable la reinfección. De manera que los cambios observados son compatibles con un rápido descenso de los anticuerpos anti-*P. vivax* que se detectan con la prueba de ELISA, luego de la terapia radical para *P. vivax*. Al respecto se ha informado de una franca disminución en el título de anticuerpos luego de la quimioterapia y de la aplicación de medidas efectivas en interrumpir la transmisión^{7, 8, 13}. Sin embargo, el seguimiento del perfil de la respuesta de anticuerpos anti-maláricos no ha sido evaluado adecuadamente como indicador de la efectividad de las medidas anti-palúdicas¹⁰.

Podemos decir que la prueba de ELISA para el diagnóstico serológico de *P. vivax* con antígenos homólogos es un ensayo sensible y específico para determinar anticuerpos anti-maláricos con

la salvedad de la reacción cruzada con *P. falciparum* lo cual puede ser una ventaja si se trata de determinar la presencia de anticuerpos anti-maláricos en aquellas zonas donde coexistan ambos parásitos.

Todos los pacientes estudiados por nosotros referían un primer episodio palúdico, quizá por ello los títulos de anticuerpos fueron relativamente bajos (1:400, para 70% de la muestra). Es una situación diferente a la descrita en las zonas holoendémicas de Africa, donde la población adulta expuesta por muchos años a la transmisión malárica tiene títulos de anticuerpos anti-maláricos relativamente altos^{10, 21, 23}, lo que también hemos observado en las poblaciones amerindias del Amazonas venezolano (PÉREZ, SANCHEZ, MARTINEZ & AZOCAR, manuscrito en preparación).

Debemos mencionar que la correlación determinada entre el diagnóstico parasitológico e inmunológico en nuestros pacientes con un primer episodio palúdico fue de 93%. Esto significa que la prueba puede tener un valor predictivo bajo en poblaciones recientemente infectadas y con baja prevalencia y nos alerta sobre la necesidad de mejorar las preparaciones antigénicas a propósito de concertar las ventajas de la ELISA y la evaluación serológica, en zonas donde la morbilidad malárica sea reciente.

SUMMARY

The immunoenzymatic assay (ELISA) in the serodiagnosis of *Plasmodium vivax*

ELISA was evaluated for the serodiagnosis of *Plasmodium vivax* using homologous antigen. This was a crude fraction obtained after detergent (NP-40) lysis of human parasitized red blood cells. Antibodies of the classes IgM, IgG, IgA were determined in a pool of eleven sera from patients with *P. vivax* malaria. The protein A was introduced as secondary probe to screen *P. vivax* antibodies in 30 sera of patients harboring a first episode of *P. vivax* malaria. There was a correlation of 93% with the parasitological diagnosis and the test resulted specific and reproducible.

AGRADECIMIENTO

Se agradece la colaboración técnica del Lic. José Bolívar y el constante apoyo de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental del MSAS. Vaya también nuestro agradecimiento al Banco Municipal de Sangre de Caracas, especialmente a la Dra. Luz Nuñez por su desinteresada colaboración en la donación de las muestras controles.

Financiado por OPS/DRS/RG Ven 86/126 y CONICIT S1-1849.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL KAISSI, S. & MOSTRATOS, A. — Assessment of substrates for horseradish peroxidase in enzyme immunoassay. *J. Immunol. Meth.*, 58: 127-132, 1987.
2. AVRAHAM, H.; GOLENSER, J.; SPIRA, D. T. & SULITZEANU, D. — *Plasmodium falciparum*: assay of antigens and antibodies by means of a solid phase radioimmunoassay with radioiodinated staphylococcal protein A. *Trans roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 75: 421-425, 1981.
3. BARNWELL, J. W. — Antigens of *Plasmodium vivax* blood stage parasites identified by monoclonal antibodies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81 (Suppl. 2): 59-61, 1986.
4. BERZINS, K.; WAHLGREN, M. & PERLMANN, P. — Studies on the specificity of anti-erythrocyte antibodies in the serum of patients with malaria. *Clin. exp. Immunol.*, 54: 313-318, 1983.
5. BERZINS, K.; PERLMANN, H.; WAHLIN, B.; RUANGJIRACHUPORN, W.; HOGH, B.; PETERSEN, E.; BJORKMAN, A. & PERLMANN, P. — Antibodies to repeated amino acid sequence in Pf155, — a merozoite associated antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81 (Suppl. 2): 77-81, 1986.
6. BRADFORD, O. F. — Adaptation of the Bradford-protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. *Analyt. Biochem.*, 162: 11-17, 1987.
7. BRUCE-CHWATT, L. J.; DRAPER, C. C. & KONFORTION, P. — Seroepidemiological evidence of eradication of malaria from Mauritius. *Lancet*, 2: 547-551, 1973.
8. BRUCE-CHWATT, L. J.; DRAPER, C. C.; AVRAMIDIS, D. & KAZANDZOGLOU, O. — Sero-epidemiological surveillance of disappearing malaria in Greece. *J. trop. Med. Hyg.*, 78: 194-200, 1975.
9. CASTRO, J.; BORGES, L.; OTERO, M. A. & GUERREIRO, L. — Malaria. In: PEREZ, H. & HERNANDEZ, A. — Seminario sobre enfermedades tropicales en Venezuela, 1., Caracas, MCT/MSAS/OPS., 1985. p. 105-139.
10. CORNILLE-BROGGER, R.; MATHEWS, H. M.; STOREY, J.; ASHKAR, T. S.; BROGGER, S. & MOLINEAUX, L. — Changing patterns in the humoral immune response to malaria before, during and after the application of control measures: a longitudinal study in the West African savanna. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 56: 579-600, 1978.
11. GABALDON, A.; BERTI, A. L.; GUERRERO, L. & GARCIA MARTIN, G. — Erradicación de la malaria en Venezuela. Programa evolución y estado actual. *Rev. venez. Sanid.*, (Supl. al No. 3): 290-336, 1961.
12. GABALDON, A. — What can and cannot be achieved with conventional anti-malaria measures. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 27: 653-658, 1978.
13. GREENWOOD, B. M. — The impact of malaria chemoprophylaxis on the immune status of Africans. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 62 (suppl): 69-75, 1984.
14. KRONVALL, G. & WILLIAMS JR., R. C. — Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. *J. Immunol.*, 103: 828-833, 1969.
15. MACKEY, L. J.; MCGREGOR, I. A.; PAOUNOVA, N. & LAMBERT, P. H. — Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection in man: detection of parasite antigens by ELISA. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 60: 69-75, 1982.
16. NOTANI, G. W.; PARSONS, J. A. & ERLANDSEN, S. L. — Versatility of *Staphylococcus aureus* Protein A in immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1438-1444, 1979.
17. QUAKYI, I. A. — The development and validation of an enzyme linked immunosorbent assay for malaria. *Tropenmed. Parasitol.*, 31: 325-333, 1980.
18. ROMANO, E. & ROMANO, M. — *Staphylococcal* protein A bound to colloidal gold a useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy. *Immunochemistry*, 14: 711-715, 1977.
19. SHERMAN, I. W. — Membrane structure and function of malaria parasites and the infected erythrocyte. *Parasitology*, 91: 609-645, 1985.
20. TANDON, 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.
21. TARGETT, G. A. T. — Antibody response to *Plasmodium falciparum* malaria. Comparison of immunoglobulin concentrations, antibody titres and the antigenicity of different asexual forms of the parasite. *Clin. exp. Immunol.*, 7: 501-517, 1970.
22. VOLLER, A.; BIDWELL, D.; HULDT, G. & ENGVALL, E. — A microplate method of enzyme linked immunosorbent assay and its application to malaria. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 51: 209-211, 1974.
23. VOLLER, A.; CORNILLE-BRÖGGER, R.; STOREY, J. & MOLINEAUX, L. — A longitudinal study of *Plasmodium falciparum* malaria in the West African savanna using the ELISA technique. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 58: 429-438, 1980.

24. WAHLGREN, M.; BERZINS, K.; PERLMANN, P. & PERSSON, M. — Characterization of the humoral immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. II. IgG subclass levels of anti-*P. falciparum* antibodies in different sera. *Clin. exp. Immunol.*, 54: 135-142, 1983.
25. ZOUALI, M.; DRUILHE, P.; GENTILINI, M. & EYQUEM, A. — High titres of anti-T antibodies and other haemagglutinins in human malaria. *Clin. exp. Immunol.*, 50: 83-91, 1982.

Recebido para publicação em 13/7/1989.