

INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO SOBRE MALÁRIA EM ESCOLARES DE MARABÁ, PARÁ

Marcos BOULOS (1), Antonio Carlos CENEVIVA (2), Mário SHIROMA (3), Mário E. CAMARGO (4)
e Euclides A. de CASTILHO (5)

RESUMO

Realizou-se inquérito sorológico para malária em escolares de Marabá — Pará, por meio de testes de imunofluorescência (IF) para anticorpos IgG e IgM, tendo como antígenos *P. falciparum* e *P. gallinaceum*, e teste de hemaglutinação (HA) com *P. gallinaceum*. O teste IF-IgG com *P. falciparum* foi positivo em 6,94% dos 389 indivíduos estudados e o de *P. gallinaceum* em 11,56%, havendo concordância entre ambos os testes em 88,68% das amostras. No total, observou-se 14,91% de casos reagentes em qualquer dos testes. O teste com *P. gallinaceum* se mostrou mais abrangente provavelmente devido a maior prevalência na região de infecções por *P. vivax*. Ao se dividir a população estudada em faixas etárias de 6 a 10 anos (grupo A) e de 11 a 16 anos (grupo B), observou-se diferença significativa de reatividade ao teste IF-IgG com *P. falciparum* (2,68% para A e 10,94% para B) mas não com *P. gallinaceum* (10,10% para A e 12,97% para B). Para os testes IF-IgM houve positividade de 2,83% na população, e para o teste de HA de 1,80%, sem diferença significativa entre os grupos etários A e B.

INTRODUÇÃO

Os testes sorológicos têm sido utilizados desde muito, na caracterização epidemiológica da malária. A reação de fixação de complemento (RFC) foi inicialmente usada para este fim e juntamente com o índice esplênico e exame parasitológico constituíam-se nos únicos recursos disponíveis. Para grandes estudos populacionais estes métodos apresentam vários inconvenientes. A RFC é um método que envolve padronização constante de reagentes lábeis e na malária sua realização apresenta dificuldades técnicas na obtenção de antígenos. A determinação do índice esplênico, além de exigir exame clínico individualizado, não retrata com fidedignidade o quadro da malária. O exa-

me parasitológico, principal método diagnóstico da malária, quando aplicado em inquéritos epidemiológicos onde a grande maioria das amostras é negativa, é um método cansativo podendo inclusive levar a falhas técnicas.

Com a descrição dos testes de imunofluorescência para malária, abriram-se novas perspectivas para diagnóstico e principalmente para estudos populacionais.

Assim a IF e posteriormente as reações de hemaglutinação passaram a ser amplamente utilizadas em inquéritos epidemiológicos tornando a incidência de malária, mais determinada em várias regiões do mundo.

- (1) Prof. Assistente do Departamento de Medicina Tropical e Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP.
- (2) Responsável pelo Setor de Malária do Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical da USP.
- (3) Professor Adjunto do Departamento de Medicina Tropical e Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP.
- (4) Prof. Assist. Dr. Chefe do Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Faculdade de Medicina da USP.
- (5) Prof. Adjunto do Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da USP.

Existem divergências de opiniões no que concerne à especificidade e sensibilidade dos antígenos empregados.

Deve se salientar que plasmódios de malária animal, são obtidos com maior facilidade no laboratório e podem ser utilizados como antígenos na detecção de malária humana, graças a reações cruzadas. Entretanto, é conceito generalizado que o emprego de plasmódio homólogo como antígeno, confere maior sensibilidade e especificidade ao teste¹⁴.

Dentre os plasmódios de animais utilizados como antígenos, em trabalhos de campo destacam-se *P. c. bastianelli*², *P. fieldi*¹¹, *P. brasilianum*¹⁸, *P. knowlesi*⁸ e *P. berghei*¹⁶. Dos plasmódios humanos destacam-se *P. vivax*^{6,7,19}, *P. falciparum*^{5,7,13,15,18,19} e *P. malariae*⁶.

O *P. gallinaceum* como antígeno em testes de IF tem mostrado boa sensibilidade e especificidade na detecção de malária humana^{1,9,20}, entretanto não foi ainda utilizado em inquéritos populacionais.

CENEVIVA & CAMARGO⁴ descreveram teste de aglutinação de hemácias de aves parasitadas com *P. gallinaceum* (HA_g) para pesquisa de anticorpos IgM em malária humana. O teste foi reagente em 99% dos pacientes com infecção ativa.

No Brasil apesar da grande prevalência, são poucos os inquéritos soroepidemiológicos de malária^{7,8}.

Os objetivos deste trabalho são: Caracterização soroepidemiológica da malária em escolares de Marabá e, comparação dos resultados obtidos nos diferentes testes e antígenos empregados.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra, constituída de soros de 389 escolares do 1.º grau da rede oficial de ensino de Marabá, foi obtida dos elementos sorteados, que representaram 10% dos matriculados no segundo semestre de 1977.

Os soros devidamente acondicionados foram enviados ao Laboratório de Sorologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, onde foram processados.

Os escolares eram compreendidos dentre os limites de 6 a 16 anos de idade, e as cur-

vas de distribuição da amostra, por faixa etária e por sexo foram correspondentes à da população visada.

O material foi dividido em dois lotes objetivando analisar-se a influência da variável idade no comportamento dos testes sorológicos. Assim o primeiro lote foi constituído de soro de escolares na faixa etária de 6 a 10 anos (**Grupo A**) e o segundo na de 11 a 16 anos (**Grupo B**).

Testes Sorológicos

Os testes sorológicos empregados foram os de imunofluorescência (IF) para anticorpos IgG e IgM, tendo como antígeno *P. falciparum* e *P. gallinaceum* e teste de hemaglutinação (HA_g) com *P. gallinaceum*.

Imunofluorescência (IF)

Sangue de paciente, com infecção recente e alta parasitemia por *P. falciparum* foi processado para maturação a esquizontes como descrito por LOPEZ-ANTUÑANO¹². O antígeno foi distribuído em lâminas e os testes realizados como descritos por SULZER & col.¹⁷, com conjugados anti-IgG e anti-IgM (Hyland-travenol laboratories).

Para o teste de IF com *P. gallinaceum* utilizou-se a técnica de KIELMANN & WEISS¹⁰. A linhagem de *P. gallinaceum*, recebida do Instituto René Rachou em 1974 e mantida aciclicamente no Laboratório de Sorologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, foi utilizada como antígeno, em extensões de sangue de aves agudamente infectadas.

Hemaglutinação (HA_g)

O teste de HA_g foi realizado segundo técnica de microtitulação como descrito por CENEVIVA & CAMARGO⁴.

Análise Estatística

Para análise estatística, considerou-se nível de significância de 5%.

Foram utilizadas: a) estatística de χ^2 de Pearson para teste de hipóteses sobre independência; b) estatística de McNemar para proporções correlatas; c) estatística "t", para com-

paração entre duas médias de populações independentes, supondo-se igualmente de variâncias.

RESULTADOS

Dos 389 escolares incluídos nessa pesquisa, 188 pertenciam à faixa etária de 6 a 10 anos (**Grupo A**), e 201 à de 11 a 16 anos (**Grupo B**).

Os resultados do teste de IF para pesquisa de anticorpos da classe IgG com antígeno de **P. gallinaceum** estão resumidos na Tabela I.

T A B E L A I

Resultados do teste de IF para pesquisa de anticorpos IgG com antígeno de **P. gallinaceum** em 389 escolares de Marabá, distribuídos segundo a faixa etária

X	Grupo A	Grupo B
0	169	175
1	9	8
2	6	6
3	4	9
4	0	3
Total	188	201

Grupo A — 6 a 10 anos; Grupo B — 11 a 16 anos; X — Escala de reatividade dos soros; 0 — Soros não reagentes; 1 — Soros reagentes à diluição 1:20; 2 — Soros reagentes à diluição 1:40; 3 — Soros reagentes à diluição 1:80; 4 — Soros reagentes à diluição 1:160.

Os resultados da estatística "t" aplicada à Tabela I não mostrou resultados significativamente diferente entre os dois grupos etários ($p > 0,05$).

Os resultados do teste de IF para pesquisa de anticorpos da classe IgG com antígeno **P. falciparum** estão na Tabela II.

T A B E L A II

Resultados do teste de IF para pesquisa de anticorpos IgG com antígeno de **P. falciparum** em 389 escolares de Marabá, distribuídos segundo a faixa etária

X	Grupo A	Grupo B
0	183	179
1	3	9
2	0	8
3	1	3
4	1	2
Total	188	201

Grupo A — 6 a 10 anos; Grupo B — 11 a 16 anos; X — Escala de reatividade dos soros; 0 — Soros não reagentes; 1 — Soros reagentes à diluição 1:20; 2 — Soros reagentes à diluição 1:40; 3 — Soros reagentes à diluição 1:80; 4 — Soros reagentes à diluição 1:160.

O emprego da estatística "t" na Tabela II nos dá o valor de 2,7821 ($p < 0,05$), mostrando portanto resultados significativamente diferentes entre os dois grupos etários.

Dadas as diferenças de positividade observadas nas reações de IF para detecção de anticorpos IgG com antígenos **P. gallinaceum** e **P. falciparum**, procurou-se estabelecer a correlação entre os resultados desses testes.

A Tabela III resume os resultados positivos ao teste da IF na detecção de anticorpos IgG com antígenos dos dois plasmódios.

T A B E L A III

Resultados do teste de IF para detecção de anticorpos IgG em 389 escolares de Marabá, com antígenos de **P. gallinaceum** e de **P. falciparum**

Plasmodium gallinaceum	Reação negativa		Reação positiva		Total
Plasmodium falciparum	Reação negativa	331	31		362
	Reação positiva	13	14		27
Total		344	45		389

O emprego da estatística de McNemar na Tabela III, nos fornece como resultado $\chi^2 = 6,56$ ($p < 0,05$), havendo portanto diferença significativa no teste de IF, com emprego dos dois antígenos.

Os resultados do teste de IF para pesquisa de anticorpos da classe IgM, com antígenos de **P. falciparum** e de **P. gallinaceum** estão resumidos na Tabela IV.

T A B E L A IV

Resultados do teste de IF para pesquisa de anticorpos da classe IgM com antígenos de **P. falciparum** ou **P. gallinaceum** em 389 escolares de Marabá, distribuídos segundo a faixa etária

Grupo	Reação de imunofluorescência (IgM)		Total
	Negativa	Positiva	
A	184	4	188
B	194	7	201
Total	378	11	389

A — 6 a 10 anos; B — 11 a 16 anos

O emprego da estatística χ^2 na Tabela IV mostra que os resultados não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Os resultados do teste de aglutinação (HAg) encontram-se resumidos na Tabela V.

T A B E L A V
Resultados do teste de HAg realizado em 389 escolares de Marabá, distribuídos segundo a faixa etária

Grupo	Reação de aglutinação		Total
	Negativa	Positiva	
A	185	3	188
B	197	4	201
Total	382	7	389

A — 6 a 10 anos; B — 11 a 16 anos

A comparação dos resultados positivos, nos dois grupos, na Tabela V, não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Na observância dos resultados obtidos na medição de anticorpos da classe IgG por IF, notou-se diferença nítida quando se utilizou *P. falciparum* e *P. gallinaceum* como antígenos.

Assim, verificou-se positividade maior quando se empregou *P. gallinaceum* como antígeno, positividade essa igualmente distribuída pelas duas faixas etárias, enquanto que quando empregou-se *P. falciparum*, resultou em positividade maior para a faixa etária maior.

A positividade maior, quando se utiliza *P. gallinaceum* como antígeno, confirma sua alta sensibilidade na detecção de anticorpos na malária humana, superior inclusive à utilização de antígenos de plasmódio de malária humana em sistema heterólogo^{9,20}.

As diferenças observadas na comparação dos resultados das Tabelas I e II deveu-se, provavelmente, à melhor detecção de anticorpos de malária por *P. vivax* na população estudada com *P. gallinaceum*.

O achado de positividade maior no grupo etário mais idoso quando se utilizou *P. falciparum* como antígeno de IF vem de encontro aos estudos de outros Autores em regiões endêmicas^{3,13}, isto devido às reinfeções pelo *P. falciparum*, levando à manutenção de anticorpos circulantes, detectáveis por vários anos.

Por outro lado, o não encontro desta maior positividade na faixa etária maior, quando se empregou *P. gallinaceum* como antígeno, tem

como explicação provável o fato de que este antígeno detecta população de anticorpos distinta daquela detectada em sistema homólogo, anticorpos estes que seriam de menor duração, sendo então não detectáveis por muito tempo.

A comparação entre os resultados dos testes de IF, realizados com antígenos distintos, permite concluir que a infecção palúdica na população estudada ocorre, provavelmente, com maior frequência por *P. vivax*.

Na avaliação da Tabela III observamos que aproximadamente 15% da população estudada teve contato com malária o que é uma prevalência relativamente alta para a faixa etária abrangida.

Por outro lado, o emprego associado de *P. falciparum* e *P. gallinaceum* como antígenos de IF, torna o inquérito mais abrangente na detecção de malária humana, fato este já observado por WEISS & DEGRÉMONT²⁰.

Não se tem conseguido resultados fidedignos na determinação de anticorpos da classe IgM pelo teste de imunofluorescência provavelmente por interferência de diversos fatores, diminuindo a especificidade (ex. fator reumatóide), ou a sensibilidade (qualidade do antígeno). Esses fatores poderiam ser imputados, talvez, como responsáveis pela não coincidência dos resultados das reações HAg e IF na pesquisa de anticorpos da classe IgM, neste trabalho. Observa-se ainda que, em se tratando de anticorpos IgM, não houve diferença de positividade nas duas faixas etárias consideradas, tanto em reação de aglutinação como IF, dados estes concordantes com os de BRUCE-CHWATT³.

A baixa taxa de positividade do teste HAg é o reflexo da baixa incidência de doença atual nessa população, e deve-se provavelmente a dois fatores: 1) os escolares participam do programa "merenda escolar", estando a maior parte do dia na escola, sem contato com o anofelino; 2) pela localização das escolas no perímetro urbano, a maior parte dos estudantes residem na cidade sem contato com a zona rural onde se dá a transmissão.

Outros estudos empregando-se *P. gallinaceum* como antígeno de IF em associação a antígenos das espécies de plasmódios humanos prevalentes na região, fazem-se necessários para uma melhor aferição do referido teste.

SUMMARY

Malaria seroepidemiologic survey in school population of Marabá, Pará

A malaria serologic survey was carried out in first grade school children from Marabá, PA. Immunofluorescence (IF) test was used for the detection of IgG and IgM antibodies to *P. falciparum* and to *P. gallinaceum*. Also, hemagglutination (HA) test with *P. gallinaceum* infected erythrocytes was employed.

The IF-IgG test with *P. falciparum* was positive in 6.94% of the 389 individuals studied, and the IF-IgG test with *P. gallinaceum* in 11.56%. Agreement between both tests was observed in 88.68% of sera. A total 14.91% reactive cases were seen by any of the two tests. The IF test using *P. gallinaceum* as antigen showed higher positivity than *P. falciparum* probably due to the predominance of *T. vivax* infection in that area.

A statistically significant difference ($P < 0.05$) was observed for IF-IgG test with *P. falciparum* antigen between the age group A (6 to 10 years) and group B (11 to 16 years). However, this was not seen when *P. gallinaceum* antigen was applied.

The positivity obtained in IF-IgM and HA tests were respectively 2.83% and 1.80%, with no significant differences between the referred age groups ($P > 0.05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMBROISE-THOMAS, P.; DRAPER, C. C.; TRUONG, T. K. & GOULLIER, A. — Valeur et limites de l'antigène *P. gallinaceum* par le serodiagnostic du paludisme humain par IF. *Bull. WHO* 46: 856-861, 1972.
2. AMBROISE-THOMAS, P.; WENDSDORFER, W. H.; GRAB, B.; CULLEN, J. & BERTAGNA, P. — Longitudinal sero-epidemiologic study of malaria in Tunisia. *Bull. WHO* 54: 355-367, 1976.
3. BRUCE-CHWATT, L. J.; DODGE, J. S.; DRAPER, C. C. & TOPLEY, E. — Seroepidemiological studies on populations groups previously exposed to malaria. *Lancet* I: 512-514, 1972.
4. CENEVIVA, A. C. & CAMARGO, M. E. — *P. gallinaceum* parasited chicken erythrocytes in a practical hemagglutination test for IgM antibodies in human malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 622-626, 1979.
5. CORNILLE BRÖGGER, R.; MATHEWS, H. M.; STOREY, J.; ASHKAR, T. S.; BRÖGGER, S. & MOLI-NEAUX, 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. WHO* 56: 579-600, 1978.
6. DRANGA, A.; MARINOV, R. & MIHAI, M. — Contribution à l'étude de l'immunité résiduelle an paludisme en Roumanie. *Bull. WHO* 40: 753-761, 1969.
7. JEFFERY, G. M.; WARREN, M. W.; COLLINS, W. E. & LOBEL, H. — Application of the indirect fluorescent antibody method in a study of malaria endemicity in Mato Grosso, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 402-411, 1975.
8. KAGAN, I. G.; MATHEWS, H. M.; ROGERS, W. A. & FRIED, J. A. — Seroepidemiological studies by indirect haemagglutination test for malaria. *Bull. WHO* 41: 825-841, 1969.
9. KIELMANN, A.; SARASIN, G.; BERNHARD, A. & WEISS, N. — Further investigations on *P. gallinaceum* as an antigen in the diagnosis of human malaria. *Bull. WHO* 43: 617-622, 1970.
10. KIELMANN, A. & WEISS, N. — *P. gallinaceum* as antigen in indirect fluorescent antibody studies. *Acta Trop.* 25: 185-187, 1968.
11. LELIJVELD, J.; OTIENO, L. H. & NEUWISSEN, J. H. E. Th. — Serological studies of malaria in east Africa. II. Serological indices as parameters of progress of malaria control and eradication. *Trop. Geogr. Med.* 25: 75-83, 1973.
12. LOPEZ-ANTUNANO, F. J. — *Falciparum* malaria antigen slides for indirect immunofluorescent test made from in vitro cultures. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 68: 257, 1974.
13. MCGREGOR, I. A.; WILLIAMS, K.; VOLLER, A. & BILLEWICZ, W. Z. — Immunofluorescence and the measurement of immune response to hyperendemic malaria. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 59: 395-414, 1965.
14. MEUWISSEN, J. H. E. Th. — Antibody responses of patients with natural malaria to human and simian plasmodium antigens measured by the fluorescent antibody test. *Trop. Geogr. Med.* 20: 137-140, 1968.
15. MOLINEAUX, L.; CORNILLE BRÖGGER, R.; MATHEWS, H. M. & STOREY, J. — Longitudinal serological study of malaria in infants in the west african savanna. *Bull. WHO* 56: 573-578, 1978.
16. NOZAIS, J. P.; KY, D. I. M. & DOUCET, J. — Evolution des anticorps fluorescents anti-palustres chez de jeunes enfants vivant en zone de paludisme stable. *Med. Trop. (Mars.)* 39: 549-553, 1979.
17. SULZER, A. J.; WILSON, M. & HALL, E. C. — Immunofluorescent antibody test for parasitic disea-

- ses. V. An evaluation of thicksmear antigen in the immunofluorescent antibody test for malaria antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18: 199-205, 1969.
18. THOMAS, V. & DISSANAIKE, A. J. — Malaria endemicity among Orang Asli as determined immunofluorescent antibody tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 606, 1977.
19. WARREN, M. W.; COLLINS, W. E.; CEDILLOS, R. & JEFFERY, G. M. — The seroepidemiology of malaria in middle America. III. Serologic assessment of localized *P. falciparum* epidemics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25: 20-25, 1976.
20. WEISS, N. & DEGRÉMONT, A. — Vergleichende paufung cheir antigene fur die malaria-serologie. *Schweiz-Rundschau. Med. (PRAXIS)* 65: 742-744, 1976.

Recebido para publicação em 18/11/1982.