



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM ANÁLISES CLÍNICAS

**COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES UTILIZADAS PARA AVALIAR
POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) A AQUISIÇÃO DE
ANTICORPOS NA MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax***

EDNEI CHARLES DA CRUZ AMADOR

BELEM-PARÁ

2015

EDNEI CHARLES DA CRUZ AMADOR

**COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES UTILIZADAS PARA AVALIAR
POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) A AQUISIÇÃO DE
ANTICORPOS NA MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Análises Clínicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

EDNEI CHARLES DA CRUZ AMADOR

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Análises Clínicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maristela Gomes da Cunha

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Banca Examinadora: Prof^a. Dra. Jussara Moretto Martinelli Lemos

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Sérgio Marcelo Rodriguez Málaga

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Suplente: Prof. Dr. Francisco Acácio Alves

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Dedico este trabalho a Deus, pois sem Ele nada seria possível e à minha esposa e minhas filhas, pelo amor e dedicação durante essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir andar por esse caminho.

À minha esposa, Shyrlene e às minhas filhas, Bruna e Júlia, pelo amor incondicional, pela paciência, pelas palavras carinhosas e de incentivo e por entender a distância mesmo presente. Não tenho palavras para agradecê-las.

À minha orientadora, Professora Doutora Maristela Cunha, por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho, pelo compromisso, pela paciência, pela dedicação e por me incentivar a ultrapassar os limites para conhecer e melhorar cada vez mais. Levarei esse incentivo para o resto da minha vida.

Aos meus pais, Eduardo e Lúcia, que me deram o que de melhor os pais podem dar aos filhos: educação, valores e amor.

A Professora Doutora Jussara Lemos, pelas importantes contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

À doutora Silvia Bastos (SESPA), ao doutor Roberto Macedo (SESMA) e a Danielle Cavalcante (SESPA), por entenderem a importância dessa caminhada. Sem a ajuda e o incentivo de vocês, que foram muito importantes, teria sido mais difícil.

A todos que de algum modo me incentivaram para a realização deste trabalho.

A Rede Paraense de Malária, a FAPESPA (Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa do Pará) e a Companhia Vale, pelo apoio financeiro para a realização desse estudo.

RESUMO

Neste estudo analisamos os dados obtidos no ensaio imunoenzimático (ELISA), nas análises qualitativa e quantitativa, para avaliar o reconhecimento da proteína recombinante His₆MSP1₁₉, contendo a porção C-terminal da MSP1 de *Plasmodium vivax*, por soros de indivíduos que residem em área endêmica de malária. A área de estudo foi o município de Goianésia do Pará, Pará. Foram analisadas 544 amostras de soro, sendo 80 soros de indivíduos infectados por *P. vivax*, com diagnóstico clínico de malária e exame parasitológico positivo, realizada pelo exame da gota espessa, e 464 foram coletados de indivíduos expostos ao risco de adquirir malária, os quais residiam em localidades do município de Goianésia do Pará, área com registro de transmissão de malária. Inicialmente, as amostras de soro foram testadas em duas diluições, 1/100 e 1/1000. Os dados obtidos foram analisados por comparações dos valores de densidade óptica (DO). Posteriormente, com base nos valores de ponto de corte, analisamos a frequência de soros positivos. Considerando qualquer um dos valores do ponto de corte determinado nesse estudo e as duas diluições testadas, observamos que no grupo infectado a frequência de indivíduos positivos variou de 70,0% a 95,0%, enquanto que no grupo exposto essa variação foi de 14,48% a 62,81%. Também comparamos as análises sorológicas empregadas para determinar a concentração sérica dos anticorpos IgG. Os resultados obtidos indicam que as análises dos dados da sorologia forneceram informações consistentes no sentido de evidenciar a necessidade de padronizar tanto o procedimento técnico (diluição da amostra) quanto a análise qualitativa e quantitativa (valor do ponto de corte e determinação dos níveis séricos de anticorpos). No âmbito da validação desse ensaio para estudos que avaliam o potencial dos anticorpos como biomarcador de exposição, também realizamos a descrição imunoepidemiológica com as amostras do grupo exposto. Considerando a exposição prévia e o tempo de residência na área, os resultados confirmam a aplicação da sorologia para monitorar a exposição contínua ao parasito, em especial nos estudos relacionados a epidemiologia da transmissão da malária.

ABSTRACT

This study analyzed the data obtained in the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), performing qualitative and quantitative analyzes to assess the recognition of His6MSP119 recombinant protein containing the C-terminal portion of MSP1 Plasmodium vivax in the sera of individuals living in an endemic malaria area. The study area was the Goianésia do Pará, municipality of Para. We tested a total of 544 serum samples, being 80 of these samples from individuals infected with *P. vivax*, with clinical diagnosis of malaria and positive parasitoscopic examination of thick blood smears, the other 464 samples were collected from individuals living in areas of risk for malaria infection in Goianésia do Pará. Initially, serum samples were tested at two dilutions, 1/100 and 1/1000. Data were analyzed by comparisons of optical density values (OD). Based on cut-off values, we analyzed the frequency of positive sera. Considering any of the determined cut-off values in this study and the two dilutions tested, we found that in the infected group the frequency of individuals ranged from 70.0% to 95.0%, while in the exposed group this variation was 14.48% to 62.81%. We also compared the serological tests used to determine the serum concentration of IgG antibodies. The results indicated that the analysis of serological data provided consistent information in order to highlight the need to standardize both the technical procedure (sample dilution) and the qualitative and quantitative analysis (value of the cut-off point and determination of serum antibodies). An immune-epidemiological study was also performed using the samples from exposed group, this validation showed the potential of antibodies as a biomarker of exposure. Regarding history of previous infection and residence time in the area, our results confirm the application of antibody detection to monitor the exposure to the parasite, especially in studies about epidemiology of malaria transmission.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da distribuição dos valores de densidade óptica nos grupos infectado e exposto

Tabela 2: Valores do ponto de corte obtido nas três metodologias selecionadas para determinar a positividade no ensaio de ELISA

Tabela 3: Frequências de amostras positivas na diluição 1:100

Tabela 4: Frequências de amostras positivas na diluição 1:1000

Tabela 5: Análise estatística para comparar os valores obtidos na determinação da concentração sérica dos anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax*

Tabela 6: Comparação dos resultados da sorologia para avaliar a replicabilidade do ensaio nos grupos infectados e expostos

Tabela 7: Comparação dos resultados da sorologia e da gota espessa para avaliar a replicabilidade do ensaio nos grupos infectados e expostos

Tabela 8: Resultado da pesquisa de antígeno (GE) e anticorpo (ELISA)

Tabela 9: Porcentagem de soros que apresentaram anticorpos IgG que reconheceram a proteína recombinante His₆MSP1₁₉ distribuída por faixa etária

Tabela 10: Porcentagem de soros que apresentaram anticorpos IgG que reconheceram a proteína recombinante His₆MSP1₁₉ distribuída de acordo com o número de episódios de malária

Tabela 11: Porcentagem de soros que apresentaram anticorpos IgG que reconheceram a proteína recombinante His₆MSP1₁₉ distribuída de acordo com o tempo de residência nas localidades do município de Goianésia do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	2
1.2	EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA	3
1.3	MARCADORES SOROLÓGICOS E EXPOSIÇÃO À MALÁRIA.....	4
1.3.1	Estudos que analisaram a aquisição natural de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ e a exposição ao <i>Plasmodium vivax</i>.....	9
1.3.2	Aplicação do ensaio imunoenzimático (ELISA) para identificar marcadores sorológicos na malária.....	12
1.4	OBJETIVOS.....	15
1.4.1	Objetivo geral	15
1.4.2	Objetivos específicos	15
2	MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1	TIPO DE ESTUDO E ÁREA DE ESTUDO	16
2.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	16
2.3	DIAGNÓSTICO PARASITOSCÓPICO POR GOTA ESPESSA.....	17
2.4	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE His ₆ -MSP1 ₁₉ CONTENDO ANTÍGENO DE <i>Plasmodium vivax</i>	17
2.5	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI-MSP1 ₁₉ DE <i>Plasmodium vivax</i>	18
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
2.7	ASPECTOS ÉTICOS.....	19
3	RESULTADOS	20
4	DISCUSSÃO	32
5	CONCLUSÕES	39
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é uma doença parasitária de grande relevância no âmbito das medidas de controle das doenças infecciosas, pois representa uma importante causa de morbidade e mortalidade em humanos, em especial nas áreas tropicais, onde as condições de vida são determinadas pelo baixo poder econômico (Sachs & Malaney, 2002). A malária é causada por cinco espécies de protozoários do filo Apicomplexa, do gênero *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Essa última espécie foi descrita mais recentemente, assumindo considerável importância epidemiológica por causar infecções adquiridas como zoonose, descritas em pacientes da Ásia, especialmente Malásia, Tailândia, Mianmar, Filipinas e Singapura (Cox-Singh et al., 2008; Luchavez et al., 2008; Lee et al., 2009). Enquanto que, o *P. ovale* apresenta transmissão natural apenas em áreas localizadas no continente Africano (Mueller et al., 2008). Entre essas cinco espécies que infectam o homem, o *P. falciparum* e o *P. vivax* são as mais prevalentes no mundo. A espécie de maior distribuição geográfica é o *P. vivax*, entretanto a infecção por *P. falciparum* constitui um problema mais grave, devido a ocorrência de cepas resistentes aos antimaláricos e o grande número de casos de malária grave, que podem resultar em altas taxas de mortalidade (WHO, 2013).

As infecções por *P. vivax* raramente evoluem para o óbito, mas esta espécie não pode ser negligenciada, considerando que, nas últimas décadas, observa-se que o número de casos de malária grave por *P. vivax* aumentou consideravelmente, bem como os relatos de cepas resistentes a antimaláricos em diferentes partes do mundo (Baird et al., 2004; Baird et al., 2007; Arévalo-Herrera et al., 2010). No Brasil, a malária é causada, por três espécies, o *P. vivax*, responsável pela maioria dos casos registrados (70% a 85%), o *P. falciparum* e o *P. malariae* (WHO, 2013).

Em países tropicais e subtropicais a malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública, onde são estimados cerca de 515 milhões de casos de malária a cada ano. Em algumas áreas do mundo, a malária é considerada erradicada. Entretanto, estima-se que 40% da população mundial ainda vive em áreas com risco de adquirir a doença (WHO, 2013), incluindo a região Amazônica, onde a transmissão está associada com a ocupação intensificada da área.

1.2. EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

No Brasil, 99,95% dos casos de malária ocorrem nos estados da Amazônia Legal e as principais medidas de controle visam interromper a transmissão. Nos últimos sete anos, o número de casos variou entre 230 e 550 mil (Brasil, SVS/MS, 2013). Em 2012, foram registrados em 235.153 casos de malária no Brasil. Nos estados do Pará, Amazonas, Amapá, Roraima, Rondônia, Acre, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão foram registrados 235.037 casos. Nessas áreas, a distribuição da malária apresenta-se variável e mais de 80% dos casos foram causados por *P. vivax*. No Estado do Pará, foram registrados 80.305 casos de malária, dos quais os municípios de Anajás, Itaituba, Jacareacanga, Oeiras do Pará e Pacajá foram responsáveis por 58% dos casos. Esses mesmos municípios contribuíram com aproximadamente 34% do total de casos ocorridos no Brasil e na região amazônica, nesse período (Brasil, Ministério da Saúde/SVS/2013; Brasil/SIVEP/MS, 2013).

Em toda a região amazônica não há uma distribuição uniforme da malária, observam-se áreas de diferentes níveis de transmissão. As áreas de colonização recente são, frequentemente, as áreas de maior transmissão (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010), principalmente garimpos, (Sawyer, 1993), populações ribeirinhas e assentamentos (Alves *et al.*, 2002), onde vários fatores como condições precárias de moradia associadas aos hábitos da população favorecem a transmissão. Outro aspecto importante é o avanço do desmatamento e o estabelecimento da agricultura, em polos de assentamentos rurais. Em áreas com desenvolvimento urbano, a transmissão da malária parece substancialmente reduzida, sendo o risco de novas infecções influenciado por fatores do comportamento humano e/ou atividades que favorecem a exposição ao mosquito vetor (De Castro *et al.*, 2006; Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010).

No ano de 2012, foram estimados cerca de 3,4 bilhões de pessoas vivendo sob o risco da malária. Desse total, 2,2 bilhões estão em áreas de baixo risco (<1 caso/1000 habitantes registrados), dos quais 94% vivem em regiões geográficas que não pertencem a África. Entre os 1,2 bilhões de pessoas que residem em áreas de alto risco (>1 caso/1000 hab. registrados) a grande maioria está África (47%) e Região Sudeste da Ásia (37%) (WHO, Malaria Report, 2013). Nas Américas e no Caribe, 15,97% da população (aproximadamente 144 milhões de pessoas) de 21

países reside em áreas onde existe algum risco da transmissão da malária (OPAS, 2007).

A principal estratégia para o controle da transmissão da malária é realizado por meio da detecção e tratamento dos casos positivos. Para tanto, o diagnóstico rápido e seguro é a primeira etapa dessa estratégia (Brasil, Ministério da Saúde/SIVEP-Malária-<http://portal.saude.gov.br>). Assim, deve ser ressaltada a importância das estratégias para monitorar riscos em áreas com potencial para instalar e/ou aumentar a intensidade da transmissão. O método parasitológico para a pesquisa de *Plasmodium sp*, realizado pela técnica da gota espessa é o padrão ouro, definido pela OMS (Brasil, SVS/Manual de diagnóstico da malária, 2009). A vantagem é a especificidade, na identificação das espécies que causam a malária humana.

A intensidade da transmissão da malária é uma variável que pode ser utilizada para avaliar situações e definir prioridades nas ações de controle da doença. Assim, novas estratégias que utilizam métodos rápidos, de baixo custo e de fácil execução para estimar a intensidade da transmissão local podem ser utilizadas em substituição aos métodos entomológicos e parasitológicos, que são limitados nesses aspectos. Desta forma, tem sido proposto utilizar o tempo de aquisição dos anticorpos para estimar a taxa de soroconversão, uma vez que o aumento na proporção de soros positivos apresentou correlação com a intensidade da transmissão (Drakeley *et al.*, 2005; Corran *et al.*, 2007).

1.3 MARCADORES SOROLÓGICOS E EXPOSIÇÃO À MALÁRIA

O padrão de transmissão da malária é um aspecto epidemiológico que influencia a resposta imunológica dos indivíduos expostos naturalmente aos antígenos do parasito. Os estudos que analisam a epidemiologia da transmissão e a aquisição de anticorpos podem contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imune capaz de conferir algum grau de proteção. Esses estudos também avaliam novas propostas de estratégias aplicadas para o controle da malária baseadas na exposição e manutenção dos níveis dos anticorpos (Drakeley *et al.*, 2005; Corran *et al.*, 2007; Bousema *et al.*, 2011).

A análise sorológica pode ser utilizada para inferir o padrão de transmissão da malária recente, onde estudos longitudinais não são logisticamente viáveis. A

presença de anticorpos pode refletir padrões recentes ou acumulativos da exposição à malária, mas não a confirmação de infecção patente, porém, pode ser continuamente reforçada, estando sob a influência de variações sazonais nas taxas de transmissão da malária. Em determinadas situações, pode ser mais fácil a pesquisa dos anticorpos, quando comparada com as avaliações de prevalência de parasito, determinada em estudos longitudinais (Drakeley *et al.*, 2005).

A utilização da sorologia para a detecção de anticorpos na malária não é um procedimento para confirmar uma infecção patente. A presença de anticorpos não implica, necessariamente, que a infecção está ativa, pois mesmo após a cura, os anticorpos permanecem no sangue. Diante disso, nas regiões endêmicas ou onde houve transmissão, o uso dos métodos sorológicos tem sido proposto para estimar o grau de endemicidade da doença, auxiliar na detecção de infecções maláricas sintomáticas ou assintomáticas, detectar alterações sazonais na transmissão; investigar se há reintrodução da malária em determinadas áreas, bem como avaliar as atividades dos programas de controle da malária (Rey, 2001).

É importante ressaltar que a resposta de indivíduos contra as formas sanguíneas do parasito, particularmente em pessoas não imunes, pode contribuir para a patologia da doença, mas por outro lado, a resposta imune pode ser também altamente efetiva, moderando ou até mesmo protegendo dos efeitos clínicos da infecção e, conseqüentemente, reduzindo a mortalidade (Stevenson & Riley, 2004).

Na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na imunidade naturalmente adquirida, o quadro definido a partir de estudos imunoepidemiológicos sugere que a aquisição de imunidade contra sintomas clínicos é relativamente lenta e incompleta; embora a imunidade à malária grave possa ser adquirida mais rapidamente, mesmo após um único episódio da doença (Gupta *et al.*, 1999). Em áreas onde indivíduos são intensamente expostos, a aquisição natural de anticorpos tem sido confirmada por vários estudos imunoepidemiológicos.

Em áreas não-endêmicas de malária, a utilização dos métodos sorológicos são ferramentas úteis na triagem de doadores de sangue, na elucidação de casos clínicos indefinidos, na avaliação da terapia medicamentosa, no diagnóstico de casos com exame parasitológico negativo, porém fortemente suspeitos, como no caso de pessoas que regressam de zonas endêmicas, e detectar indivíduos assintomáticos ou com formas latentes da doença (Rey, 2001).

Estudos visando o desenvolvimento de vacinas mostram evidências da produção de anticorpos protetores contra antígenos da fase assexuada do ciclo de vida do parasito, incluindo os antígenos da família da Proteína da Superfície do Merozoíto (MSP). Entre os principais antígenos dessa família estão a MSP-1, MSP-3 e MSP-9. Devido a importância no processo de invasão das hemácias pelo *P. vivax*, também tem sido analisada a aquisição de anticorpos específicos contra a Proteína Ligante de Duffy (Duffy Binding Protein/DBP. Nesse caso, observou-se a presença de anticorpos inibidores da ligação a PvDBP II estava associada a proteção da infecção por *P. vivax* (King et al., 2008), podendo conferir uma imunidade protetora nos casos de parasitemia elevada (Cole-Tobian et al, 2009). Outro estudo analisou a resposta de anticorpos após vacinação, utilizando peptídeos sintéticos derivados da proteína circum esporozoíta (CS), e comparou com a resposta contra as formas sanguíneas, utilizando antígenos nativos do *P. vivax* no teste de imunofluorescência, houve positividade tanto contra os três peptídeos quanto o reconhecimento dos esporozoítos sanguíneos.

O uso de dados de soroprevalência da malária para inferência epidemiológica está sujeito a limitações. Embora as tendências de médio e longo prazo de transmissão da malária podem ser estimadas por meio de ajuste de modelos relativamente simples para os dados sorológicos, algumas características epidemiológicas que são relevantes para controle da malária, como a distribuição de positivos por idade são analisadas para estimar a longevidade dos marcadores sorológicos. Tais estudos têm sido conduzidos em populações que vivem em áreas com endemicidade variada de malária, localizadas na Ásia e América do Sul, utilizando principalmente antígenos de fase assexuada, principalmente a MSP1₁₉, AMA-1 e CSP.

Na epidemiologia da transmissão, os dados de medida clássicos, como a prevalência de parasitos e as medidas entomológicas, e dados da sorologia fornecem informações complementares, que podem ser usadas para entender os padrões de transmissão de malária, identificar grupos de risco e propor medidas de controle baseadas em evidências. Para tanto, foram estimados os níveis de anticorpos da classe IgG contra a PvMSP-1₁₉ e PfMSP1₁₉ em populações expostas a malária, que vivem em regiões remotas da bacia amazônica e os resultados mostraram altas taxas de prevalência de anticorpos IgG contra a PvMSP-1₁₉, com

diferenças significativas de acordo com a idade, local de residência e envolvimento com atividades de alto risco (Ladeia-Andrade et al., 2007).

Recentemente, Dacuma e colaboradores (2012) utilizaram o ELISA para pesquisa de anticorpos que reconheceram a proteína recombinante *Pv*-MSP-1₁₉, em amostras de soro coletadas nas Filipinas. Nesse estudo foi possível observar a aplicação dessa análise para identificar focos de transmissão residual e avaliar os efeitos das medidas de controle na província de Sarangani, Filipinas. Os dados obtidos refletem o declínio na transmissão de *P. vivax*, mantido em níveis baixos. Foi observado heterogeneidade na exposição à malária em nível microepidemiológico, contribuindo para a avaliação de programas de controle em áreas onde marcadores convencionais não são eficientes para detectar a transmissão em baixos níveis. Esses resultados mostram que essa análise pode fornecer informação valiosa sobre quais áreas são mais susceptíveis a transmissão, caso ocorra uma epidemia.

Um estudo anterior, realizado com amostras de indivíduos que residem em uma área onde a transmissão da malária foi reduzida, consideravelmente, ao longo das últimas décadas, mostrou a utilização de marcadores sorológicos com a finalidade de avaliar a intensidade da transmissão. Foi determinada a soroprevalência em uma coorte transversal, os ensaios foram realizados após a coletas das amostras em papel filtro e pesquisa de anticorpos por ELISA. Foram pesquisados anticorpos IgG contra proteínas recombinantes *Pf*-MSP-1₁₉ e *Pf*-AMA e extrato de esquizonte de *P. falciparum* e dois antígenos de *P. vivax*, a proteína de *Pv*-MSP-1₁₉ (cepa Belém). Em geral, a positividade para os antígenos de *P. falciparum* foi 9,4%, 12,4% e 16,6% para *Pf*-MSP-1₁₉, *Pf*-AMA1 e *Pf*-SE, respectivamente e 12,6% e 15,0% para *Pv*-MSP-1₁₉ e *Pv*-AMA1, respectivamente.

Em outro estudo, que analisou os níveis de anticorpos na malária, testando amostras coletadas, no ano de 2008, em área de baixa endemicidade, localizada na Somália, Bousema e colaboradores (2010), analisaram marcadores sorológicos (MSP-1₁₉ e AMA-1), e observou heterogeneidade na reatividade dentro da área estudada, confirmando que os marcadores sorológicos representavam variação na exposição à malária.

A análise da aquisição de anticorpos mesmo em áreas, localizadas em países fora da zona de maior impacto de exposição à malária, como é o caso da Europa, mostrou variação na resposta de anticorpos, porém, confirmando que esta resposta

pode refletir a situação de endemidade. Esse estudo foi conduzido na Turquia, e foram pesquisados anticorpos das classes IgM e IgG, utilizando como antígenos as proteínas PvMSP-1₁₉ and PvSERA4, observou-se que a presença de IgG foi considerada como marcador da exposição mesmo em uma área de exposição limitada ao *P. vivax* (Yidez-Zeyrek et al, 2010).

No Brasil, os estudos conduzidos para analisar a aquisição de anticorpos, com diferentes propósitos relacionados a aplicação como marcadores imunológicos, foram realizados também com um outro membro da família da MSP de *P. vivax*, a PvMSP-9, quando compararam amostras coletadas em diferentes períodos e associou a presença desses anticorpos ao risco de adquirir malária (Lima-Junior et al., 2008, 2012). Anteriormente, outro estudo analisou a resposta de anticorpos em amostras coletadas em cinco estados da região amazônica (Rondônia, Pará, Mato Grosso, Amazonas, e Acre), para determinar a frequência de positivos que apresentaram anticorpos contra proteína circum-esporozoíta (CSP) de *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* VK210, *P. vivax* VK247e *P. vivax-like*. Nesse caso, foi descrito um padrão variável de resposta entre as diferentes áreas. No entanto, no Pará e em Rondônia, o perfil de resposta observado foi semelhante. No caso do reconhecimento dos peptídeos derivados da CS de *P. vivax*, avaliado pela detecção de anticorpos anti-CSP (epítomos repetidos) de *P. vivax* VK210, VK247 e *P. vivax-like*, foi observada resposta positiva em amostras coletados em todos os estados investigados (Arruda et al, 2007).

Além da aquisição de anticorpos contra a porção C-terminal da MSP1, também tem sido descrito a aquisição de anticorpos que reconhecem a proteína recombinante porção N-terminal (ICB-2-5) (Soares et al., 1997, Soares et al., 1999). Recentemente, foi descrito a aquisição de anticorpos capazes de reconhecer essa mesma porção terminal, porém utilizando uma proteína recombinante de 200KDa (Pv200L). Tal estudo mostrou que em amostras de indivíduos em área endêmicas de malária no Brasil, localizadas na região amazônica, nos estados do Amapá, Pará, Rondônia e Acre, a prevalência de positivos foi alta, confirmando que anticorpos específicos contra o fragmento PvL200 da PvMSP-1 foi imunogênico, durante exposição natural ao *P. vivax* (Storti-Melo et al., 2011).

Neste estudo, assim como no que foi conduzido por Arruda e colaboradores, foi observada a diferença de prevalência de anticorpos entre as áreas estudadas.

Uma explicação para essas diferenças pode ser a variação na exposição à malária, influenciada pela ampla variedade encontrada no padrão de transmissão da malária, polimorfismo dos antígenos do parasita e a base genética da população.

Os estudos de imunoepidemiologia que associaram a presença de anticorpos com a exposição, analisaram a aquisição de anticorpos contra a PvMSP1 e PvAMA-1, e mostraram que as proporções de positivos e os níveis de anticorpos contra PvAMA-1 estão correlacionados com o nível de exposição em áreas com transmissão de intensidade de baixa a moderada, localizadas no norte do Brasil. (Morais et al., 2006, Bueno et al., 2011). Mais recentemente, foi confirmada a alta reatividade de anticorpos de indivíduos naturalmente infectados tanto para a molécula completa de PvAMA-1 como para o fragmento DII (Bueno et al., 2011).

Os estudos comparativos da resposta de anticorpos que reconhecem a PvMSP-1₁₉ e a PvAMA-1 sugerem que a resposta a esses antígenos contribui para a efetividade das preparações vacinas, uma vez que tais antígenos podem estimular a resposta imune, favorecendo a destruição do parasita (Bueno, 2008; Pandey, 2010).

No Brasil, devido à importância epidemiológica da malária causada por *P. vivax*, a aplicação de novas análises para avaliar o efeito da exposição aos antígenos do parasita, poderá fornecer informações relevantes relacionados à caracterização dos antígenos e a aquisição de anticorpos contra esses antígenos. Entre estas análises está a identificação de marcadores sorológicos para monitorar a intensidade da transmissão, visando fornecer alternativas complementares para compor estratégias preventivas para o controle da malária causada por *P. vivax*.

1.3.1 Estudos que analisaram a aquisição natural de anticorpos IgG anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ e a exposição ao *Plasmodium vivax*

Estudos soroepidemiológicos mostraram que indivíduos expostos à malária causada por *P. vivax* produzem anticorpos que reconhecem a região C-terminal da Proteína 1 de Superfície do Merozoíto (PvMSP1₁₉). Na região Amazônica, a resposta imune naturalmente adquirida contra esta proteína foi, inicialmente, caracterizada em indivíduos residentes no Estado do Pará. Comparou-se o reconhecimento imune de nove proteínas recombinantes baseadas na proteína

MSP1₁₉ de *P. vivax* por anticorpos e, constatou-se que a proteína PvMSP1₁₉ foi imunogênica para a maioria dos indivíduos expostos ao *P. vivax* (Soares *et al.*, 1997, Cunha *et al.*, 2002). Posteriormente, outros estudos confirmaram a alta imunogenicidade dessa proteína, mostrando que a soroprevalência de anticorpos IgG pode variar de 60 a 90% (Morais *et al.*, 2005; Barbedo *et al.*, 2007).

A comparação do reconhecimento imune de proteínas recombinantes contendo a MSP1₁₉ de *P. vivax*, produzidas em três diferentes vetores de expressão em bactéria *E. coli*, demonstrou que a proteína recombinante His₆-MSP1₁₉ produzida pelo vetor pET foi a mais imunogênica em indivíduos expostos à malária causada por *P. vivax*, quando comparada aos outros dois recombinantes, GST-MSP1₁₉ e MBP-MSP1₁₉. Além disso, a imunização de camundongos com o antígeno recombinante His₆-MSP1₁₉ foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos quando comparada às demais proteínas (Cunha *et al.*, 2002).

A duração da resposta de anticorpos contra *P. vivax* foi observada durante curto período de tempo após o tratamento da infecção. Esta curta duração da resposta humoral foi descrita em estudo que analisou a resposta de anticorpos de indivíduos infectados por *P. vivax* contra os antígenos recombinantes contendo as porções N- e C- terminal da MSP-1. Os níveis de anticorpos IgG contra a região C-terminal foram significativamente mais elevados que contra a porção N-terminal durante infecção patente, e diminuíram após o tratamento (Soares *et al.*, 1999b). Esses resultados sugerem que os níveis de anticorpos diminuem rapidamente após o tratamento, o que pode contribuir para o alto risco de re-infecção desses indivíduos.

Outro estudo observou que a longevidade da resposta de anticorpos foi mantida por longo período de tempo, porém os níveis estavam diminuídos em relação ao período da infecção. No entanto, os resultados mostraram que os níveis baixos de anticorpos contra o antígeno MSP1₁₉ persistiram por mais de 30 anos, na ausência da infecção. Esse longo período de tempo foi relacionado à memória da resposta imune humoral, o que possivelmente conferiu o reconhecimento de MSP1₁₉ por anticorpos (Lim *et al.*, 2004). Também foi observado que a prevalência de soros positivos contra o antígeno recombinante foi influenciada pelo número de episódios de malária (Soares *et al.*, 1997). Estes resultados indicam a necessidade de mais estudos sobre a resposta de anticorpos contra antígenos de *P. vivax*.

Vários estudos conduzidos com amostras coletadas em áreas de transmissão de malária, localizadas na Amazônia têm demonstrado alta antigenicidade da porção C-terminal da MSP1, particularmente dos fragmentos de 42 KDa e 19KDa. Além de bastante imunogênico, tem sido atribuído ao fragmento de 19 KDa uma participação relevante no processo de invasão das hemácias, durante a fase sanguínea do ciclo assexuado (Soares et al., 1997, Cunha et al., 2002; Barbedo et al. 2007).

Em um estudo recente, foi determinada a frequência de soros positivos em amostras de indivíduos infectados por *P. vivax*, e observou-se que os soros apresentaram anticorpos que reconheceram a porção C-terminal, a positividade foi muito alta, alcançando 98% de reconhecimento, e a IgG1 foi o isotipo que estava em maior concentração (Mourão et al., 2012). Portanto, tem sido observado um padrão semelhante para os estudos desenvolvidos para caracterizar a aquisição da resposta imune humoral contra esse antígeno, em áreas onde há diferentes níveis de exposição, considerando a endemicidade da malária.

Em 2007, Barbedo e colaboradores compararam a resposta de anticorpos a três antígenos candidatos a vacina de *P. vivax*. Para tanto, utilizaram proteínas recombinantes contendo a PvMSP-1₁₉, PvAMA-1 e PvDBP-RII. Foram analisadas 220 indivíduos residentes no estado do Pará, e que apresentavam infecção patente por *P. vivax*. A frequência de indivíduos com anticorpos anti-PvMSP-1₁₉, PvAMA-1, and PvDBP-RII foi 95%, 72,7% e 44,5%, respectivamente. Esta comparação mostra que a MSP1₁₉, foi a mais reconhecida entre as demais, indicando ser este um antígeno alvo com características favoráveis, para conduzir estudos relacionados a aquisição e manutenção dos anticorpos, incluindo os estudos relacionado ao desenvolvimento de vacinas e outros propostos para compreender aspectos da resposta imune e a epidemiologia.

Na ilha de Cotijuba, localizada no município Belém, capital do estado do Pará, na década de 90 ocorria focos transmissão de malária por *P. vivax*, e foi avaliada a resposta de anticorpos contra a PvMSP-1₁₉, comparando a resposta a região N-terminal da MSP1 com a porção C-terminal (PvMSP1₁₉) e antígenos do extrato total das formas sanguínea. A frequência total dos indivíduos com IgG contra estágios eritrocitários, PvMSP-1₁₉ e região N-terminal da MSP1 foi 76,6%, 42,3% e 29,8%, respectivamente. A frequência da resposta a proteína recombinante de PvMSP-1₁₉ foi significativamente maior em indivíduos com história recente de malária (<6

meses). Os dados obtidos nesse estudo mostraram a alta positividade entre amostras coletadas de indivíduos expostos mais recentemente à malária.

Em 2002, Cunha e colaboradores, baseados na possibilidade da PvMSP-1₁₉ ser usada como parte da subunidade de vacina contra malária, compararam as propriedades imunogênicas da proteína recombinante PvMSP-1₁₉ expressa por diferentes vetores *Escherichia coli*. Foram usados três diferentes vetores para produzir cinco proteínas combinantes representando a PvMSP-1₁₉. As proteínas foram comparadas em termos de reatividade com um painel de soro obtido de indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax*. Entre as proteínas estudadas, a MSP-1₁₉ expressa pelo vetor pET (His₆-MSP-1₁₉) apresentou melhor reconhecimento pelos anticorpos de indivíduos expostos ao *P. vivax*.

No caso da MSP1₁₉, também foi proposto o desenvolvimento de teste sorológico para a confirmação da exposição, visando caracterizar a detecção de produtos da resposta imune contra o parasito (Rodrigues et al., 2003). A prevalência e os níveis de anticorpos que reconhecem antígenos de superfície como a MSP-1₁₉ tem sido usados como marcador de exposição a malária (Braga et al, 2002; Rodrigues et al, 2003).

Portanto, vários estudos têm sido realizados como objetivo de caracterizar a resposta de anticorpos contra antígenos de *P. vivax*, em populações que vivem em áreas com endemicidade variada de malária, tais como áreas da Ásia e América do Sul. Nessas avaliações, os antígenos da fase assexuada incluem AMA-1, CSP, e, principalmente, a MSP1. Nesse contexto, foram realizados estudos que caracterizaram a resposta imune visando, principalmente, o desenvolvimento de vacinas. Mas também é importante descrever melhor as questões relacionadas à epidemiologia da transmissão da malária, incluindo as análises dos dados obtidos por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), o método de referência na identificação dos marcadores sorológicos na malária.

1.3.2 Aplicação do ensaio imunoenzimático (ELISA) para identificar marcadores sorológicos na malária

Análises sorológicas podem ser empregadas para a vigilância epidemiológica da malária. Nesse caso tem sido amplamente empregado o método de ELISA, um ensaio imunoenzimático, colorimétrico, e que permite a análise de várias amostras,

produz resultados quantitativos e necessita de pequenas quantidades de reagentes. Deve-se mencionar que a correlação entre a pesquisa de antígenos por ELISA e o diagnóstico parasitológico é alta. A concordância pode alcançar 93%, quando comparamos pesquisa de componentes antigênicos com a pesquisa do parasito inteiro no exame da gota espessa. Porém, a pesquisa por ELISA apresenta valor preditivo baixo em populações com indivíduos recentemente expostos e entre os que residem em áreas com baixa prevalência (Perez & De La Rosa, 1990). Nesse caso, há necessidade de melhorar tanto as preparações antigênicas quanto a avaliação sorológica, com base nos parâmetros utilizados para validação dos ensaios laboratoriais. Nesse contexto, a detecção de antígenos por ELISA pode contribuir, fornecendo um meio de medir a capacidade de detectar pacientes assintomáticos (Doderer et al., 2007).

No caso da detecção de anticorpos por ELISA, a identificação de marcador sorológico tem sido aplicada nas situações que necessitam avaliar o risco de transmissão entre os indivíduos expostos. Em um estudo realizado para detectar anticorpos, utilizando o método de ELISA, que analisou amostras coletadas na Austrália, verificou-se que a estratégia de triagem direcionada, combinada com um teste de triagem de anticorpos de alta sensibilidade, aumentou a eficácia, quando usada em um período de restrição de doação por quatro meses, aplicada para doadores que declararam risco de ter contraído malária (Contreras et al, 2011).

Com base nos resultados obtidos por Imunofluorescência indireta (IFA) e ELISA foi proposta a substituição do IFA pelo ELISA, especialmente em bancos de sangue (Doderer et al., (2007). A sensibilidade apresentada pelo ELISA foi de 84,2% comparada a 70,5% na IFA. No entanto, investigações futuras ainda são necessária para a avaliação analítica desse método, uma vez que, em pacientes com malária, foi observado resultados falso-negativos, registrando perda de casos de infecção aguda. Em parte, esse resultado foi atribuído a janela imunológica entre a infecção e a produção de anticorpos. Além disso, deve ser ressaltada a alta variação entre os lotes de antígenos produzidos contendo formas sanguíneas do *Plasmodium*.

Os ensaios de Imunofluorescência Indireta (IFA) e ELISA foram desenvolvidos para detecção de anticorpos contra antígenos dos estágios sanguíneos. O teste de Imunofluorescência é usado por ser altamente específico e o ELISA por apresentar alta sensibilidade tanto contra antígeno nativo quanto antígeno

recombinante. Embora, a imunofluorescência seja um método demorado e subjetivo é útil em levantamentos epidemiológicos, na triagem de doadores de sangue em potencial, e, ocasionalmente, pode fornecer evidências de infecção recente em pessoas não imunes (Tangpukdee *et al.*, 2009).

O uso do ELISA na triagem de doadores em banco de sangue foi avaliado por Oh e colaboradores (2008), que relataram baixa sensibilidade (53%), porém a especificidade foi alta (94%, comparado a gota espessa), utilizando como controles soros de indivíduos normais sadios. Tal parâmetro é um importante ponto para a avaliação do uso e melhoria da padronização de protocolos de obtenção de reagentes e técnicas de diagnóstico laboratorial. Neste estudo, a perda de doadores devido a resultados falso-positivos foi de 5% entre todas as amostras testadas.

Vários estudos utilizaram o ELISA para descrever os marcadores sorológicos na malária. Recentemente, Bousema e colaboradores (2010), avaliaram a resposta de anticorpos contra *P. falciparum* e/ou *P. vivax* por meio de ELISA. As amostras foram coletadas em papel filtro, foram reconstituídas em tampão fosfato, e foram testadas na diluição 1:1.000 no reconhecimento da proteína recombinantes PfMSP-1₁₉, como antígeno. Enquanto que para o reconhecimento da PfAMA, as amostras foram testadas na diluição 1:2.000. Para antígenos de *P. vivax*, a diluição foi 1:1.000 nos testes com as duas proteínas recombinantes (PvMSP-1₁₉ e PvAMA-1).

Para estimar os níveis de anticorpos na malária, a diluição seriada e o cálculo do índice de reatividade têm sido empregados. Na avaliação da resposta contra PvAMA-1, Bouillet e colaboradores (2011) utilizaram o ELISA e as amostras foram testadas em diluição seriada de 1:100 a 1:409.600. Em geral, nos trabalhos que analisaram a aquisição natural de anticorpos IgG na malária, em amostras coletadas no Brasil, utilizaram para a avaliação qualitativa a diluição 1:100 e na análise quantitativa os níveis foram estimados por diluição seriada (Soares *et al.*, 1997, Soares *et al.*, 1999, Cunha *et al.*, 2002, Arruda *et al.*, 2007) ou por índice de reatividade (Barbedo *et al.*, 2007).

Nos estudos propostos para analisar a aquisição de anticorpos que reconhecem proteínas recombinantes de *P. vivax*, o ensaio mais utilizado é o ELISA, utilizando as proteínas recombinantes como antígenos (MSP-1₁₉, AMA-1, DBP). Porém, a análise dos dados gerados nesse ensaio pode variar conforme a diluição dos soros, o protocolo selecionado para estimar os níveis de anticorpos. Assim, a

aplicação do ELISA para descrever aspectos epidemiológicos é o método mais utilizado, devido a praticidade e a possibilidade de obter antígenos recombinantes. Entretanto, as possíveis variações decorrentes da análise dos dados ainda não foram suficientemente reavaliadas. Neste estudo, estamos propondo realizar análises descritivas e comparações, visando validar a comparação dos resultados obtidos por meio desse ensaio imunológico, com aplicação tanto para pesquisa básica quanto para ações relacionadas à vigilância epidemiológica na malária humana.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Gerar protocolos de análise de dados relacionados à aquisição de anticorpos IgG na malária causada por *Plasmodium vivax*

1.4.2 Objetivos específicos

1. Comparar os valores de densidade ótica obtidos no reconhecimento de antígeno recombinante (His₆MSP1₁₉) por soros de indivíduos infectados e expostos à malária causada por *P. vivax*.
2. Determinar valores de limiar de positividade e validar a sua aplicação em ensaios sorológicos aplicados para pesquisa de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉.
3. Comparar duas análises utilizadas para estimar os níveis de anticorpos IgG; a titulação por diluição seriada e o índice de reatividade.
4. Determinar os parâmetros de validação do ensaio para pesquisa de anticorpos por ensaio imunoenzimático (ELISA) em comparação com a pesquisa de *Plasmodium* no exame da Gota espessa.
5. Validar análises complementares relacionadas à aplicação da sorologia para identificar marcadores sorológicos que indicam exposição prévia à malária

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TIPO DE ESTUDO E ÁREA DE ESTUDO

O estudo é do tipo transversal. As amostras analisadas foram coletadas no município de Goianésia do Pará (03°50'33"S; 49°05'49"W), que está localizado na mesorregião do sudeste paraense, localizada a 274 Km da capital do Estado do Pará. A população estimada em 2013 foi de 36.500 habitantes, com base nos dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). O clima é tropical semi-úmido, apresentando temperatura média de 26,4°C, com máxima de 32,0°C e mínima de 22,7°C. A umidade relativa do ar é elevada e o índice pluviométrico anual estimado é de 2000 mm. Em 2009, o município de Goianésia do Pará foi incluído entre os cinco municípios com alto risco de transmissão de malária no Brasil.

2.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue foram coletadas durante as ações de atendimento médico, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa, Rede Paraense de Malária (CNPq/Processo 555654/2009-5). A população foi esclarecida sobre o trabalho, durante apresentação de palestras sobre a transmissão da malária. Foram coletadas 464 amostras de indivíduos adultos de ambos os sexos.

Para a realização da sorologia foram coletados 5 mL de sangue de cada indivíduo em tubos a vácuo e sem anticoagulante, que ficou a temperatura ambiente até a separação do soro. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento da pesquisa de anticorpos. A pesquisa de anticorpos foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA).

No momento da coleta, foi preparada a lâmina para a realização da pesquisa de parasitos pelo exame da gota espessa e, no momento do atendimento, foram solicitados dados como, idade, sexo, número de episódios prévios de malária e período de residência na área. Foram incluídos no estudo todos os indivíduos com idade acima de um ano e que concordarem em participar, por manifestação própria ou do responsável, e foram excluídos os que relataram apresentar outras doenças infecciosas.

2.3 DIAGNÓSTICO PARASITOSCÓPICO POR GOTA ESPESSA

O diagnóstico para pesquisa de *Plasmodium* foi realizado por técnicos especializados da Universidade Federal do Pará e do Instituto Evandro Chagas que realizaram o exame parasitoscópico pela técnica da gota espessa. Uma amostra de sangue foi obtida diretamente pela punção da polpa digital, após assepsia, e utilizando lanceta estéril. A primeira gota de sangue foi removida com algodão seco. Comprimindo o dedo suavemente, foi obtida outra gota de sangue com aspecto esférico sobre a pele seca.

A face limpa da lâmina foi colocada, então, em contato com a gota, mas sem tocar a pele do paciente. Com o auxílio de outra lâmina, o sangue foi espalhado, formando um retângulo. A preparação foi corada pelo Método de Walker, utilizando-se o corante Giemsa. A leitura foi realizada em microscópio óptico, examinando a preparação sob óleo de imersão com aumento de 1000X e foi determinado o número de parasitos por mm³ de sangue. Para tanto, foi utilizado o método de avaliação quantitativa pela contagem de 100 campos microscópicos. O volume de sangue estimado nesta área equivale a 0,2 microlitros de sangue. Para calcular o número de parasitos no volume de 1,0 microlitro, o número encontrado na leitura de 100 campos foi multiplicado por 5, calculando, assim, o número de parasitas por mm³ de sangue, sendo expresso o resultado da parasitemia por microlitro de sangue.

2.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-MSP1₁₉ CONTENDO ANTÍGENO DE *P. vivax*

A proteína recombinante His₆-MSP1₁₉ foi purificada de bactéria *E.coli* cepa BI21 transformada com o plasmídeo pET14b-MSP1₁₉. As bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio LB-ampicilina, a 37°C sob agitação constante (250 rpm). Após 16-18 horas, a cultura saturada de bactérias foi adicionada a 100 mL de meio LB-amp e incubada a 37°C sob agitação constante. Ao atingir uma DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8 foi adicionado IPTG (Isopropil-b-D-Thiogalactopyranoside), na concentração de 0,01 mM, e a cultura foi mantida a 30°C sob agitação constante (250 rpm) por 16 horas. As bactérias foram centrifugadas a 4500g por 15 minutos a 4°C. O sedimento de bactérias foi re-resuspenso em 5 mL do tampão de sonicação (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 120 mM, PMSF (Fluoreto de phenilmetilsulfonila) 1 mM, pH 7,0. As bactérias

foram lisadas pela ação desse tampão. Após essa etapa, o lisado bacteriano foi centrifugado a 12000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi incubado sob agitação em gelo com resina de níquel (Ni²⁺-NTA-agarose, Amersham). Após 1 hora, a resina foi aplicada em coluna para lavagem com o tampão de sonicação, seguida de tampão de lavagem (NaH₂PO₄ 57 mM, NaCl 128 mM, glicerina 10%, pH 6,0). As proteínas que se ligarem à coluna foram eluídas com tampão de lavagem contendo imidazol 0,5 M (Sigma) pH 6,0. O material eluído foi dialisado contra Tris-HCl 20 mM, pH 8, e, mantido a -20°C (Cunha, 2002).

Na etapa seguinte, a proteína recombinante His₆-MSP1₁₉ foi purificada por cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q (Pharmacia), equilibrada com Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, acoplada a sistema de FPLC, "Fast Protein Liquid Chromatography". As proteínas foram eluídas por um gradiente linear de 0 a 1 M NaCl neste mesmo tampão. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE. Após a diálise contra PBS, a concentração de proteína foi determinada. A etapa de purificação que utiliza o sistema FPLC, foi realizado no laboratório da Dra. Irene Soares, na Universidade de São Paulo.

2.5 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG QUE RECONHECEM A PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-MSP1₁₉ DE *P. vivax*

Os anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ foram detectados por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), conforme descrito por Cunha e colaboradores (2002), utilizando como antígeno a proteína recombinante His₆-MSP1₁₉ contendo os peptídeos 1616-1704 da MSP1 (Cepa Belém) de *P. vivax*.

A concentração da proteína recombinante MSP1₁₉ foi ajustada para 2 µg/mL em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6. Em seguida, 50 µL por poço foram adicionados a placas de 96 poços (Costar). Após incubação durante à noite a temperatura ambiente, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% e bloqueadas com PBS-leite 5% por 3 horas a 37°C. As amostras foram diluídas 1:100 e 1:1000 na solução de PBS-leite 5% e 50 µL de cada amostra foram adicionados por poço, em duplicata. Após incubação durante à noite a temperatura ambiente, as placas foram lavadas e adicionados 50 µL/poço de uma solução contendo IgG de cabra anti-IgG humano conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:10.000 em solução PBS-leite 5%.

Após 2 horas, a reação enzimática foi revelada pela adição de 1 mg/mL de o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 0,03% (v/v) de peróxido de hidrogênio. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µL de uma solução contendo H₂SO₄ 4N. A densidade óptica (DO) foi determinada em um leitor de placas de ELISA (Bio TeK) usando comprimento de onda de 490 nm (DO₄₉₀).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados em tabelas de contingência e a análise estatística foi realizada no programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007) e Excel. Para comparar os dados de densidade óptica (DO) foi utilizado o teste para determinara o coeficiente de variação ou a comparação das médias. O cálculo do valor de cut-off foi obtido com base nas equações do Biostat cutt-off e as frequências de positivos foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado.

A análise de correlação dos valores obtidos nas duas diluições testadas foi realizada pelo teste de Spearman. A comparação dos valores obtidos na quantificação dos anticorpos foi realizada pelo teste de Kruskal-wallis; após transformação dos valores obtidos na diluição seriada para escala logarítmica. Os parâmetros sorológicos (sensibilidade, especificidade, replicabilidade e acurácia), foram calculados com base no padrão ouro, a gota espessa, aplicando o teste do crivo. Para todas as análises foi estabelecido nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

2.7 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo é parte do projeto de pesquisa “Rede Paraense de malária”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas (Anexo I), conforme a resolução 196/1996, do Conselho Nacional de Saúde, que trata das diretrizes e normas regulamentares da pesquisa envolvendo seres humanos. Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa, no momento da coleta receberam informações sobre os objetivos do trabalho, riscos e benefícios (Anexo II). Em seguida, foi apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo III) que foi assinado por cada participante. As informações foram coletadas em uma ficha epidemiológica (Anexo IV).

3. RESULTADOS

3.1. Aplicação do ensaio imunoenzimático (ELISA) na detecção de anticorpos IgG para avaliar o reconhecimento de antígeno recombinante (PvMSP1₁₉) na malária humana

Com a finalidade de estabelecer análises comparativas relacionadas ao ensaio laboratorial, incluindo a realização da técnica e a análise dos valores de densidade óptica (DO) obtidos na leitura do ensaio de ELISA, a pesquisa de anticorpos da classe IgG foi realizada em 544 amostras de soro. Dessas amostras, 80 soros foram coletados de indivíduos infectados por *P. vivax*, com diagnóstico clínico de malária e exame parasitológico positivo, realizado pelo exame da gota espessa, e 464 foram coletados de indivíduos expostos ao risco de adquirir malária, os quais residiam em localidades do município de Goianésia do Pará, área com registro de transmissão de malária. No grupo exposto, 15 indivíduos apresentaram gota espessa positiva. Essas amostras foram excluídas dessa análise, assim, esse grupo foi constituído por 449 indivíduos não infectados com *P. vivax*. Para estabelecer o valor do ponto de corte (cut-off), foram analisadas 50 amostras de soros de indivíduos saudáveis.

Inicialmente, as amostras de soro foram testadas em duas diluições, 1/100 e 1/1000. Os dados obtidos foram analisados por comparações dos valores de DO, que correspondem a absorvância quantificada no comprimento de onda de 490 nanômetros (DO₄₉₀). Posteriormente, com base nos valores de ponto de corte, determinamos a frequência de soros positivos.

A análise da distribuição dos valores de DO mostrou que, nos dois grupos de indivíduos, quando as amostras foram testadas na diluição 1/100, os valores de DO não apresentaram distribuição normal ($p < 0,01$). Na diluição 1/1000, os valores apresentaram distribuição normal somente para o grupo infectado ($p > 0,05$). Na figura 1, podemos observar a análise descritiva dos valores de DO. A comparação das médias mostrou que houve diferença nos valores obtidos na diluição 1/100 e 1/1000. Nos dois grupos essa diferença foi significativa tanto na comparação entre 1/100 e 1/1000 ($p < 0,0001$). (Tabela 1).

A análise estatística foi realizada pela determinação do coeficiente de variação. Nos dois grupos, essa análise mostrou que 1/100 apresentou maior variação em comparação com 1/1000.



Figura 1: Comparação da distribuição dos valores de densidade óptica (DO) nos grupos infectado e exposto. A análise descritiva dos valores de DO nos grupos infectado (N=80) e Exposto (N=449) foi realizada com os dados obtidos na avaliação da resposta de anticorpos IgG adquirida naturalmente. A pesquisa de anticorpo foi realizada por ELISA, utilizando como antígeno a proteína recombinante PvHis₆MSP1₁₉. As amostras de soros foram testadas em duplicatas nas diluições 1/100 e 1/1000.

Tabela 1: Comparação da distribuição dos valores de densidade óptica nos grupos infectado e exposto

Análise	Infectado		Exposto	
	1/100	1/1000	1/100	1/1000
Diluição da amostra	1/100	1/1000	1/100	1/1000
Tamanho das amostras	80	80	449	449
Médias	2,5552	1,5458	1,0723	0,3455
Desvios padrões	1,0044	1,1702	0,9443	0,553
Coeficiente de variação	0,3931	0,757	0,8806	1,6007
Z =	4,3644		6,0834	
p =	< 0,0001		< 0,0001	

A comparação foi realizada pela análise do coeficiente de variação

A análise de correlação dos valores de DO obtidos nas diluições 1/100 e 1/1000 mostrou que, nos dois grupos, a correlação foi semelhante. Na primeira comparação, a maior diluição foi fixada como a variável dependente. Essa análise mostrou que houve uma correlação positiva entre as diluições (Figura 2). A análise estatística dos dados do grupo infectado forneceu o valor de $R^2 = 0,6050$, IC95% (0,67 – 0,85), $p < 0,001$ e para o grupo exposto o valor de $R^2 = 0,6317$, IC95% (0,76 – 0,83), $p < 0,001$. Portanto, podemos observar que mesmo apresentando uma boa correlação, houve diferença significativa nos valores obtidos tanto na situação de infecção patente quanto nos indivíduos não infectados.

Também realizamos a análise de correlação estabelecendo a diluição 1/100 como a variável dependente. Nesse caso, observamos que os valores no grupo infectado tendem a assumir uma distribuição mais ajustada. Enquanto que no grupo exposto, observamos uma maior dispersão dos valores de DO, sendo mais evidente nos valores maiores que 1,0. (Figura 3).

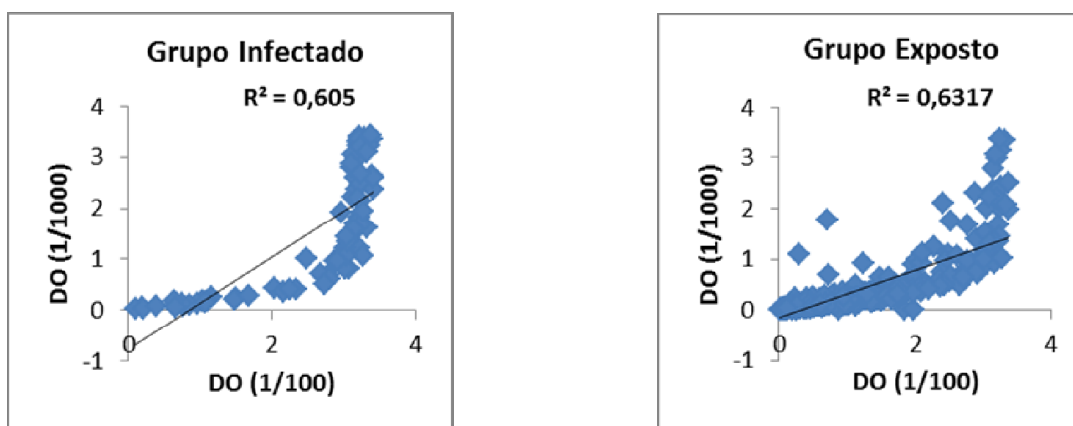


Figura 2: Análise de correlação dos valores de DO obtidos nos grupos infectado (N=80) e Exposto (N=449). A variável dependente foi a maior diluição utilizada para testar as amostra (1/1000). A pesquisa de anticorpo foi realizada por ELISA. A leitura das placas foi realizada com filtro de 490nm.

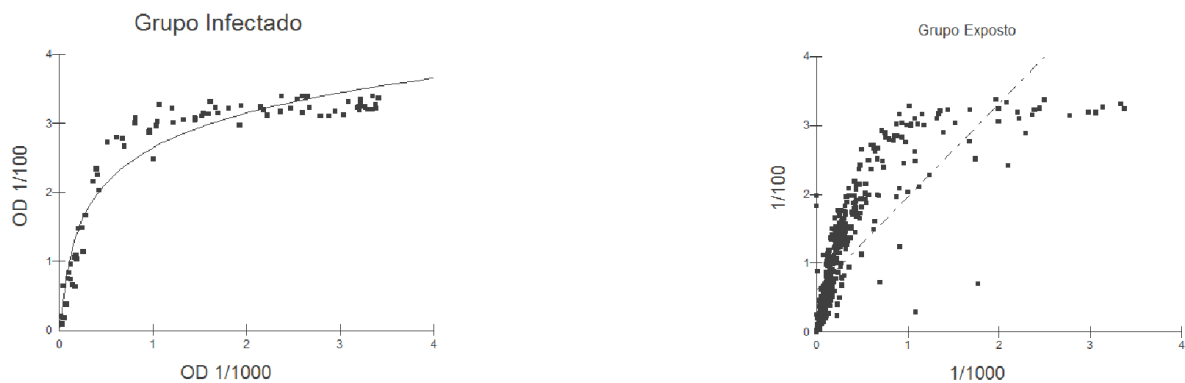


Figura 3: Análise de correlação dos valores de DO obtidos nos grupos infectado (N=80) e exposto (N=449). A variável dependente foi a menor diluição utilizada para testar as amostras (1/100). A pesquisa de anticorpo foi realizada por ELISA. A leitura das placas foi realizada com filtro de 490nm.

Considerando que nos dois grupos, quando as amostras foram testadas na diluição 1/100, os valores de DO não apresentaram distribuição normal, também analisamos a correlação pelo teste de Spearman, e observamos que os valores apresentaram-se correlacionados. Essa análise confirmou a correlação positiva tanto no grupo infectado ($R=0,8957$, $p<0,0001$); quanto no exposto ($R=0,925$ e $p<0,0001$).

Com a finalidade de validar três variações empregadas para estimar o valor do ponto de corte a ser utilizado no teste, calculamos o valor de acordo com variações na composição da amostra e na equação utilizada para o cálculo. Para isso, determinamos o ponto de corte com base nos valores de DO obtidos com três grupos de indivíduos; grupo de indivíduos sadios (N=52); um grupo misto com indivíduos doentes e sadios (N=132, sendo 80 infectados + 52 sadios) e um grupo maior com indivíduos doentes e sadios (N=544, sendo 80 infectados + 449 do grupo exposto). No grupo de indivíduos sadios, utilizamos para o cálculo uma fórmula, padronizada e amplamente empregada, baseada na média e desvio padrão (Média + 3DP). Nos grupos que incluíram doentes e sadios, utilizamos as equações do programa Biostat (Ayres et al., 2007). Os valores variaram de acordo com o cálculo, o grupo de amostras e a diluição do soro. Na diluição 1/100, os valores obtidos foram 0,463, 0,965 e 2,164; e na diluição 1/1000, os valores foram 0,236, 0,177 e 0,510. (Tabela 2).

Tabela 2: Valores do ponto de corte obtido nas três metodologias selecionadas para determinar a positividade no ensaio de ELISA

Amostras selecionadas	Cálculo utilizado	Valor do ponto de corte sensibilidade e especificidade	
		1/100	1/1000
Diluição da amostra	-----		
Indivíduos sadios (OD > 0,350; 1/100 N=31; 1/1000 N=50)	Média + 3DP	0,463	0,236
Indivíduos infectados e sadios (N=132)	1- Sensibilidade	0,965 Sen. 87,5% Esp. 92,3%	0,177 Sen. 85,0% Esp. = 90,4%
Indivíduos infectados e expostos (N=544)	1- Sensibilidade	2,164 Sen. 75,0% Esp. 84,7%	0,510 Sen. 71,3% Esp. 81,5%

DP - Desvio padrão, Sen - Sensibilidade, Esp – Especificidade.

3.2. Análise comparativa dos valores do ponto de corte para determinar a percentagem de soros positivos nos grupos infectado e exposto

Após estabelecer os valores do ponto de corte, analisamos a positividade e comparamos as frequências de soro que reconheceram a proteína recombinante (Tabela 3 e Tabela 4). Essas comparações mostraram que, aplicando qualquer um dos valores obtidos para o ponto de corte, houve diferença significativa na frequência de positivos entre o grupo infectado e o exposto ($p < 0,0001$). Essa diferença foi observada nas duas diluições testadas. Portanto, quando as amostras foram testadas nas diluições 1/100 ou 1/1000, o resultado alcançado foi semelhante. Também realizamos comparação por grupo, considerando os positivos de acordo com o ponto de corte selecionado. Nesse caso, observamos que as porcentagens variaram de acordo com os três valores, que determinaram o limiar de positividade. No grupo infectado, houve diferença significativa apenas nas frequências determinadas na diluição na diluição 1/100 ($p=0,0008$), 1/1000 ($p=0,0798$). Enquanto que no grupo exposto, a diferença foi significativa nas duas diluições ($p < 0,0001$).

Os resultados obtidos confirmaram a alta imunogenicidade desse antígeno das formas assexuadas de *P. vivax*. Tanto na diluição 1/100 quanto na 1/1000,

observamos diferença significativa na frequência de positivos no grupo infectado e exposto. No grupo infectado, a porcentagem de positivos detectados na diluição 1/100 variou de 73,75% a 95,0%, de acordo com o ponto de corte utilizado. Na diluição 1/1000 variou de 70,0% a 83,75%. No grupo exposto, a porcentagem de positivos variou de 14,48% a 62,81%, na diluição 1/100. Na diluição 1/1000 variou de 17,59% a 34,74%.

Tabela 3: Frequências de amostras positivas na diluição 1:100

Valor do ponto de corte (cut-off)	% positivos (n/N) na Diluição 1:100 Intervalo de Confiança (IC ₉₅)	
	Grupo Infectado	Grupo Exposto
0,463	95,0% (76/80) IC ₉₅ : 88,8 - 97,5	62,81% (282/449) IC ₉₅ : 57,9 - 66,6
0,965	86,25% (69/80) IC ₉₅ : 80,0 - 91,3	42,32% (190/449) IC ₉₅ : 37,6 - 45,9
2,164	73,75% (59/80) IC ₉₅ : 67,5 - 80,0	14,48% (65/449) IC ₉₅ : 10,9 - 17,4

Grupo infectado x Grupo exposto: (cut-off= 0,463 ($X^2 = 32,170$, $p < 0,0001$); cut-off= 0,965 ($X^2 = 52,448$, $p < 0,0001$); cut-off= 2,164 ($X^2 = 132,934$, $p < 0,0001$). Grupo infectado cut-off= 0,463 x 0,965 x 2,164 ($X^2 = 14,314$, $p = 0,0008$). Grupo exposto cut-off= 0,463 x 0,965 x 2,164 ($X^2 = 218,579$, $p < 0,0001$).

Tabela 4: Frequências de amostras positivas na diluição 1:1000

Valor do ponto de corte (cut-off)	% positivos (n/N) na Diluição 1:1000 Intervalo de Confiança (IC ₉₅)	
	Grupo Infectado	Grupo Exposto
0,236	81,25% (65/80) IC ₉₅ : 75,0 - 83,8	34,74% (156/449) IC ₉₅ : 31,0 - 38,3
0,177	83,75% (67/80) IC ₉₅ : 77,5 - 91,3	42,32% (189/449) IC ₉₅ : 37,9 - 45,7
0,510	70,0% (56/80) IC ₉₅ : 60,0 - 73,8	17,59% (79/449) IC ₉₅ : 14,0 - 18,55

Grupo infectado x Grupo exposto: (cut-off= 0,236 ($X^2 = 60,377$, $p < 0,0001$); cut-off= 0,177 ($X^2 = 47,180$, $p < 0,0001$); cut-off= 0,510 ($X^2 = 98,110$, $p < 0,0001$). Grupo infectado cut-off= 0,236 x 0,177 x 0,510 ($X^2 = 5,057$, $p = 0,0798$). Grupo exposto cut-off= 0,236 x 0,177 x 0,510 ($X^2 = 65,803$, $p < 0,0001$).

3.3. Comparação da análise aplicada para estimar a concentração de anticorpos IgG adquiridos por infecção ou exposição natural ao *P. vivax*

Nesta análise, foram consideradas positivas no ELISA as amostras que apresentaram densidade óptica (DO_{490}) maior que o valor do ponto de corte (cut-off), estabelecido pela média das DO dos soros dos indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de três desvios padrões. A concentração foi estimada por diluição seriada para determinação do título (o inverso da maior diluição positiva). Os valores dos títulos foram analisados após transformação para escala logarítmica (Log10). O índice de reatividade (IR) para estimar a concentração foi determinado pela razão entre o valor da DO da amostra testada na diluição 1/100 e o valor da DO do ponto de corte (cut off = 0.463). Na Figura 4, podemos observar que a média do índice de reatividade foi maior que a média da estimativa de concentração estabelecida por diluição seriada (Tabela 5). Porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($H=2,0369$; $p=0,1535$).

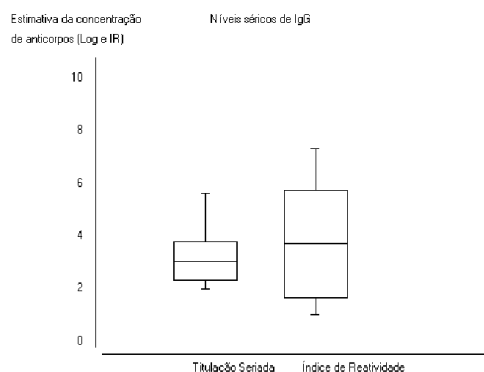


Figura 4: Comparação da análise aplicada para estimar os níveis de anticorpos IgG séricos anti-MSP1₁₉. Foram analisadas 190 amostras do grupo exposto, positivas para a pesquisa de anticorpos IgG. A concentração foi analisada pelo método semi-quantitativo para estimar a concentração de anticorpos IgG específicos por diluição seriada do soro (titulação) e pela determinação do valor do índice de reatividade (IR); obtido pela razão DO amostra/ DO cut-off.

Tabela 5: Análise estatística para comparar os valores obtidos na determinação da concentração sérica dos anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax*

Método para estimar os níveis séricos de IgG	Média	Desvio padrão	Min. - Max
Diluição seriada	3,044	0,729	2,0 – 5,612
Índice de Reatividade	3,709	2,041	1,0 – 7,305

Comparação pelo teste de Kruskal-wallis; H=2,0369; p=0,1535

3.4. Análise dos dados obtidos na detecção de anticorpos IgG por ensaio imunoenzimático (ELISA) e o diagnóstico padrão ouro pelo exame da gota espessa para a pesquisa de *Plasmodium sp*

Nesta análise, as amostras positivas na sorologia foram determinadas com os valores do ponto de corte de 0,463 e 0,236, para as diluições da amostra de 1/100 e 1/1000, respectivamente. Inicialmente, comparamos os resultados positivos e negativos, em cada grupo, para determinar a concordância e o valor obtido no teste Kappa, e, com base nesse valor, definir a conclusão da replicabilidade do ensaio. Na tabela 6, podemos observar que no grupo infectado a replicabilidade do ensaio foi fraca, porém no grupo exposto a replicabilidade foi boa.

Com a finalidade de comparar a resposta de anticorpo e a pesquisa do parasito, foram analisados os resultados no ensaio sorológico e na gota espessa (Tabela 7). As amostras positivas e negativas na pesquisa de *Plasmodium* pela gota espessa foram comparadas com a sorologia, realizada com as duas diluições.

Na diluição de 1/100 e 1/1000, observamos que 238 e 158 amostras foram positivas na sorologia e negativas na pesquisa do parasito, respectivamente. Esta comparação mostrou que, nas duas diluições, a replicabilidade foi fraca, quando comparamos o ensaio para pesquisa de anticorpos IgG e o método padrão ouro para pesquisa do parasito. Também realizamos a comparação da sorologia pelo teste do crivo/curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Na figura 5, observamos que o ponto que representa a diluição 1/1000 esta mais próxima do eixo y, indicando que nessa condição o ensaio apresenta a melhor combinação de especificidade e sensibilidade.

Tabela 6: Comparação dos resultados da sorologia para avaliar a replicabilidade do ensaio nos grupos infectados e expostos

Resultado da sorologia	GRUPOS		Total
	Infectado	Exposto	
Positivo 1/100 e Positivo 1/1000	65	157	222
Positivo 1/100 e Negativo 1/1000	11	126	137
Negativo 1/100 e Positivo 1/1000	0	1	1
Negativo 1/100 e Negativo 1/1000	4	165	169
Total	80	449	

Total de amostras da análise 529 (80 + 449). Comparação no Grupo Infectado: Concordância = 0,8625; Kappa=0,3714; Conclusão da replicabilidade: Fraca. Comparação no Grupo Exposto: Concordância = 0,7124; Kappa=0,4637; Conclusão da replicabilidade: Boa.

Tabela 7: Comparação dos resultados da sorologia e da gota espessa para avaliar a replicabilidade do ensaio nos grupos infectados e expostos

Resultados Gota espessa e ELISA	SOROLOGIA		Total
	1/100	1000	
Positivo GE e Positivo ELISA	75	65	140
Positivo GE e Negativo ELISA	4	15	19
Negativo GE e Positivo ELISA	283	158	441
Negativo GE e Negativo ELISA	166	291	457
Total	529	529	

GE – Gota espessa. ELISA – Ensaio imunoenzimático. Total de amostras da análise 529 (80 + 449). Comparação GE x ELISA 1/100 - Sensibilidade: 95,0%, Especificidade: 36,97%, Concordância: 0,4575; Kappa: 0,1314; Conclusão da replicabilidade: FRACA. Comparação Comparação GE x ELISA 1/1000 - Sensibilidade: 81,01%, Especificidade: 64,81%, Concordância: 0,6730; Kappa: 0,2656; Conclusão da replicabilidade: FRACA.

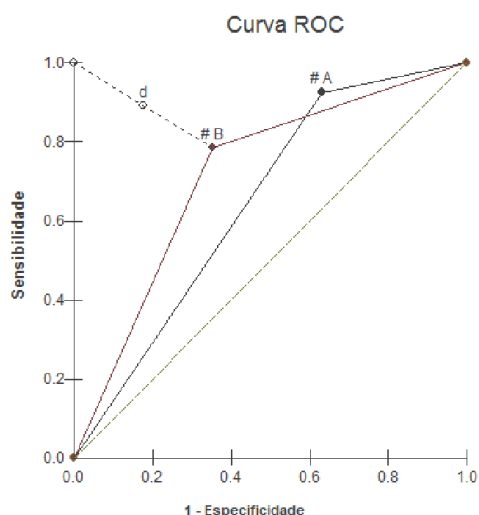


Figura 5: Curva ROC obtida na análise da sorologia para pesquisa de anticorpos IgG anti-MSP₁₉. As amostras foram testadas nas diluições 1/100 (A) e 1/1000 (B).

Tabela 8: Resultado da pesquisa de antígeno (GE) e anticorpo (ELISA)

Testes	Grupo infectado		Total	Grupo exposto		Total
	Positivo	Negativo		Positivo	Negativo	
Gota espessa	80	0	80	15	449	464
Sorologia 1:100	76	4	80	294	170	464
Sorologia 1:1000	65	15	80	167	297	464

Total = 80 + 464 = 544. No grupo exposto, foram incluídas 15 amostras que apresentaram GE positiva.

3.5. Aplicação dos marcadores sorológicos para monitorar a exposição a malária.

A descrição de aspectos epidemiológicos e imunológicos relacionados à resposta imune humoral na malária tem por finalidade identificar marcadores de exposição, no contexto da epidemiologia da transmissão da malária. Para tanto, analisamos a frequência de soros positivos e três variáveis que podem indicar exposição à malária; a idade, o número de episódios prévios de malária e o tempo de residência na área endêmica de malária.

A frequência de soros que apresentaram anticorpos IgG específicos contra a His₆MSP₁₉ foi analisada por faixa etária. Na tabela 9, observamos que nas cinco faixas analisadas a frequência de positivos variou entre 33,35% e 39,1%. Os valores

percentuais foram semelhantes, não havendo diferença significativa nos diferentes grupos etários ($X^2 = 1,038$; $p = 0,9039$). Nesta análise foram incluídos 464 participantes, com idade entre 3 e 74 anos; a média da idade de todos os participantes foi 32,2 anos (Desvio padrão = 17,3 anos).

O número de episódio pode influenciar na aquisição e manutenção dos anticorpos. Nessa análise, foram agrupados os indivíduos que relataram nunca terem tido malária e os que relataram um, dois, três e quatro ou mais episódios (Tabela 10). No grupo que relatou nunca ter tido malária, a porcentagem de soros positivos foi 17,2%. No grupo que relatou exposição prévia à malária, a porcentagem de indivíduos que apresentaram soros positivos variou de 40,4% a 41,3%, sendo que a menor porcentagem foi observada no grupo que relatou ter tido um episódio de malária e a maior porcentagem de positivos foi observada no grupo que relatou ter tido quatro ou mais episódios.

A comparação entre todos os grupos mostrou diferença estatística significativa entre o grupo que relatou nunca ter sido exposto a malária e os demais grupos, os quais relataram de um a quatro episódios prévios de malária ($X^2 = 19,275$; $p = 0,0007$).

Outra variável analisada foi a informação acerca do tempo que cada participante residia na localidade, onde as amostras foram coletadas. Essas informações foram agrupadas em períodos que variaram de menos de um ano a mais de cinco anos (Tabela 11). O grupo que relatou residir há mais de cinco anos na área apresentou a maior frequência de soros positivos (91,7%), enquanto que no grupo de indivíduos que relatou residir a menos de um ano apresentou a menor frequência (32,4%). Nos demais grupos, a frequência de soros positivos foi semelhante, sendo 46,2% (1-2 anos) e 38,3% (3 - 4 anos).

A comparação entre todos os grupos mostrou que houve diferença estatisticamente significativa, os grupos que relataram residirem há menos de cinco anos apresentaram porcentagem menor que o grupo dos que residiam há mais de cinco anos apresentaram ($X^2 = 102,950$; $p < 0,0001$).

Tabela 9: Porcentagem de soros que apresentaram anticorpos IgG que reconheceram a proteína recombinante His₆MSP1₁₉ distribuída por faixa etária

Idade (anos)	% de soros positivos*	IC 95%
≤ 15	35,1 (40/114)	24,6 - 43,0
16 - 25	33,3 (21/63)	19,1 - 41,3
26 - 35	33,7 (32/95)	20,0 - 37,9
36 - 45	37,7 (29/77)	27,3 - 46,8
≥ 46	39,1 (45/115)	21,3 - 47,0

* Diluição do soro: 1:1000. Qui-Quadrado = 1,038; p=0,9039

Tabela 10: Porcentagem de soros que apresentaram anticorpos IgG que reconheceram a proteína recombinante His₆MSP1₁₉ distribuída de acordo com o número de episódios de malária

No de Episódios	% de soros positivos*	IC 95%
0	17,2 (17/99)	10,1 - 21,2
1	40,7 (22/54)	29,6 - 48,2
2	40,4 (19/47)	31,9 - 44,7
3	41,0 (16/39)	30,8 - 51,3
≥ 4	41,3 (92/223)	35,9 - 46,6

* Diluição do soro: 1:1000; Qui-Quadrado = 19,275; p=0,0007

Tabela 11: Porcentagem de soros que apresentaram anticorpos IgG que reconheceram a proteína recombinante His₆MSP1₁₉ distribuída de acordo com o tempo de residência nas localidades do município de Goianésia do Pará

Tempo de residência em anos (anos)	% de soros positivos*	IC 95%
< 1	32,4 (11/34)	20,6 - 41,2
1 - 2	46,2 (43/93)	36,6 - 52,7
3 - 4	38,3 (51/133)	30,1 - 45,1
≥ 5	91,7 (132/144)	87,5 - 93,8

* Diluição do soro: 1:1000; Qui-Quadrado = 102,950; p<0,0001

4. DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos os dados obtidos no ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizado na pesquisa qualitativa e quantitativa de anticorpos, para avaliar o reconhecimento da proteína recombinante His₆MSP1₁₉, contendo a porção C-terminal da MSP1 de *P. vivax*, por soros de indivíduos que residem em área endêmica de malária. A área de estudo foi o município de Goianésia do Pará, Pará, e foram analisadas amostras de indivíduos infectados e não infectados, com base no resultado da pesquisa de *Plasmodium*, pelo exame da gota espessa.

Inicialmente, realizamos análise comparativas dos valores obtidos na leitura da densidade óptica (DO), com a finalidade de avaliar as possibilidades apresentadas na literatura, para determinar o valor do ponto de corte (cut-off), e, assim, classificar os indivíduos em resultado positivo ou negativo, na pesquisa de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉. Os valores obtidos foram utilizados para determinar as frequências de soros positivos, e, em seguida, realizar as comparações entre os grupos de indivíduos (infectados e expostos) e comparações no mesmo grupo, com base no resultado qualitativo do ensaio de ELISA. Também analisamos as duas formas descritas na literatura, aplicadas para estimar a concentração dos anticorpos, fornecendo resultados quantitativos.

Posteriormente, utilizamos os dados dessa fase inicial, para selecionar o valor do ponto de corte e a diluição da amostra, e realizamos um estudo de soroepidemiologia, com a finalidade de avaliar o grau de exposição à malária, utilizando os anticorpos IgG como biomarcador para monitorar a intensidade da transmissão da malária, em áreas endêmicas, como proposto por Cunha e colaboradores (2014).

Os resultados obtidos na primeira parte desse estudo, quando analisamos os procedimentos relacionados ao protocolo do ensaio de ELISA (diluição da amostra) e a análise dos dados de DO, mostraram que houve variação entre os valores do ponto de corte. Na diluição 1/100 o valor mínimo foi 0,463 e o máximo foi 2,164. Na diluição 1/1000 o valor mínimo foi 0,177 e o máximo 0,510. Até o presente momento, não encontramos na literatura dados relacionadas a esse tipo de comparação, baseada em diferentes valores de ponto de corte, obtido com grupos selecionados. Tais grupos foram compostos com amostras de indivíduos sadios ou sadios e doentes. Outra possibilidade para definir o ponto de corte é por um mix-model.

Nesse caso, considera-se a concentração dos anticorpos por faixa etária (Vyse et al., 2006, Rota et al., 2008). Essa análise é mais complexa e não foi incluída nessa etapa do estudo. Dever ser enfatizado que, essa análise é relevante uma vez existem diferentes formas de calcular esses valores. Além disso, parte dos estudos de sorologia em malária, analisam as amostras diluídas 1/100, incluindo quase a totalidade dos estudos realizados no Brasil, enquanto que nos estudos realizados na Europa e Ásia, utilizam tanto 1/100 e quanto 1/1000 (Bosuema et al., 2010, Dacuma et al, 2012).

A frequência de indivíduos infectados que apresentaram IgG anti-MSP1₁₉ foi similar para ambas as diluições, apesar de se observar frequência um pouco maior quando as amostras são diluídas 1/100, esta diferença não foi significativa. Porém a proporção de indivíduos expostos, quando as amostras foram testadas na diluição 1/1000 foi significativamente menor comparado à proporção de positivos detectados na diluição 1/100, sendo a positividade calculada com o valor do ponto de corte utilizado mais frequentemente nos estudos sorológicos na malária humana (média+3DP). A percentagem de positivos no grupo infectado com qualquer ponto de corte aplicado variou menos que no grupo exposto. Uma explicação pode ser devido a alta concentração de anticorpos nos indivíduos infectados.

Considerando qualquer valor de cut-off e ambas as diluições, observamos que no grupo infectado a frequência de positivos variou 70,0% a 95,0%, enquanto que no grupo exposto variou de 14,48% a 62,81%. Esta foi a primeira análise realizada com amostras coletadas nessa área do Estado do Pará e os resultados estão de acordo com os obtidos em outros estudos realizados. No estado do Pará, com amostras de soro de indivíduos expostos naturalmente à malária, observou-se que entre os indivíduos que residiam em uma área insular pertencente ao município de Belém, a Ilha de Cotijuba, onde houve vários ciclos de focos de transmissão de malária, a positividade variou de 22,1% (Nina, 2002) a 42,3% (Soares *et al.*, 1999a). Em amostras de indivíduos residentes em localidades dos municípios de Trairão e Itaituba, a porcentagem de positivos foi 64,42% e 20,22%, respectivamente (Leite, 2007).

Vários estudos que avaliaram a aquisição de anticorpos IgG específicos contra a região C-terminal da MSP1 (MSP1₁₉), em áreas de transmissão de malária na Amazônia brasileira, mostraram que a porcentagem de positivos em indivíduos

com infecção patente ou expostos variou entre 20% e 95% nos diferentes estudos (Soares *et al.*, 1997, 1999a, 1999b; Cunha, 2002, Rodrigues *et al.*, 2003; Ladeia-Andrade *et al.*, 2007, Barbedo *et al.*, 2009). Estudo realizado com amostras coletadas em Belém, Pará, mostrou que em indivíduos infectados e com variação na intensidade de exposição à malária, apresentaram níveis de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-PvMSP1₁₉, sendo que a subclasse IgG1 foi predominante em indivíduos que relatam maior exposição a malária (Soares *et al.*, 1997, Moraes *et al.*, 2005).

A utilização de teste sorológico (ELISA) para a detecção de anticorpos específicos contra a proteína recombinante PvMSP1₁₉ de *P. vivax* tem sido proposta, considerando que esse teste apresenta alta especificidade e sensibilidade para detecção de anticorpos em indivíduos infectados, assintomáticos ou com infecção sub-patente (Lim *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2003). Portanto, esse teste tem potencial para ser aplicado em estudos imunoepidemiológicos e para determinar a carga de parasito que pode circular em uma determinada área, em especial nas áreas de baixa endemicidade (Lim *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2003).

Na última década, estudos imunoepidemiológicos têm utilizado a pesquisa de anticorpos como marcador sorológico para estimar a intensidade de transmissão da malária (Drakeley *et al.*, 2005; Corran *et al.*, 2007; Bousema *et al.*, 2010; Cook *et al.*, 2011; Olotu *et al.*, 2012). Porém, esta aplicação tem sido mais avaliada para áreas onde o *P. falciparum* é a espécie mais prevalente. Recentemente, foi realizado o primeiro estudo no Brasil, aplicando essa estratégia e confirmando que para o *P. vivax*, os anticorpos IgG também são biomarcadores de exposição à malária (Cunha *et al.*, 2014). Diante dessa possibilidade, é relevante dar continuidade a caracterização da aquisição de anticorpos, uma vez que muito pouco tem sido avaliado no contexto da transmissão do *P. vivax*.

Nessa linha de pesquisa, muitos estudos foram conduzidos na América do Sul, sendo que a maioria foi realizada no Brasil. Um número menor foi realizado em outras áreas, localizadas na África e na Ásia. Nesses estudos, observou-se considerável heterogeneidade na resposta de IgG anti-PvMSP-1₁₉, e também para outras proteínas. As possíveis causas dessa heterogeneidade incluem as variações na intensidade da transmissão, fluxo das populações devido migrações e a diversidade metodológica entre os estudos, incluindo o uso de diferentes diluições. No Brasil, a maioria dos estudos analisou soro de indivíduos infectados e as

amostras foram testadas na diluição 1/100, em outros países, em geral, as amostras foram testadas mais diluídas (1/1000). (Soares et al., 1999; Cunha et al., 2002; Rodrigues et al., 2003; Drakeley et al., 2005; Bousema et al., 2010; Mourão et al., 2012; Cutts et al., 2014).

Estudos epidemiológicos longitudinais também são necessários para melhor esclarecer a manutenção dessa resposta de anticorpos. Algumas situações podem contribuir para a maior longevidade da resposta, incluindo infecções assintomáticas, que tem sido registrada em diferentes áreas da região Amazônica brasileira (Alves et al., 2002).

Na área selecionada para esse estudo há registro de casos de malária por três espécies de *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*) (Brasil, 2013). Entretanto, as amostras foram positivas na gota espessa somente para a pesquisa de *P. vivax*. Os dados do Ministério da Saúde mostram que esta espécie de *Plasmodium* é a mais prevalente no Brasil, sendo responsável por mais de 70% dos casos (WHO, 2012; Oliveira-Ferreira et al., 2010).

Com base nos dados do sistema de vigilância epidemiológica da malária do Ministério da Saúde (Sivep/malária), durante o período de coleta das amostras, houve diminuição no número de casos de malária registrados no município de Goianésia do Pará. Em 2010, foi registrado o maior número de casos do período (7.787 casos de malária) e, após 2 anos, em 2012, houve expressiva redução (1.647 casos) (Costa et al., 2013). A incidência parasitária Anual (IPA) em 2010 e 2012 foi 255,8 e 53,1, respectivamente.

No grupo exposto, os resultados obtidos na sorologia confirmam que houve exposição prévia à malária na população em estudo. Foram detectados indivíduos que apresentaram anticorpos IgG específicos contra a região C-terminal da MSP1₁₉ do *P. vivax*, alcançando níveis de positividade observada entre indivíduos infectados, que pode variar entre 60% e 97% (Barbedo et al., 2007). A porcentagem de soros que reconheceram a proteína recombinante foi 95,0% e 62,85%, nos grupos infectado e exposto, respectivamente. Nesse caso, utilizamos o ponto de corte calculado e aplicado na grande maioria dos estudos de soropidemiologia, realizados no Brasil, pelos grupos de pesquisa que atuam em malária causada por *P. vivax* (Soares et al., 1997, Barbedo et al., 2007).

Outro aspecto analisado nesse estudo foi a metodologia proposta para determinar os níveis dos anticorpos específicos. Para tanto, foram tituladas 190 amostras positivas, pertencentes ao grupo exposto. Observamos que tanto a estimativa realizada pela diluição seriada (titulação) quanto na determinação pelo índice de reatividade ($IR = \frac{DO \text{ amostra}}{DO \text{ ponto de corte}}$), apresentaram níveis de IgG semelhantes. Deve ser considerado, que o grau de investimento em reagentes e tempo para realizar a titulação seriada é alto. Enquanto que no cálculo do IR, os custos são mais baixos e poderá fornecer resultado quantitativo preciso, os quais constituem uma informação valiosa, em especial para a realização de estudos imunoepidemiológicos longitudinais.

Para comparar quanto a eficiência e a concordância com os casos positivos detectados pela pesquisa do parasito (exame da gota espessa), foram avaliados os valores de sensibilidade e especificidade do ensaio sorológico. No análise com amostras diluídas 1/100 e 1/1000, a sensibilidade do ELISA foi 92,47% e 78,49%, respectivamente. Porém na diluição 1/1000, observamos maior valor no teste Kappa, para analisar a concordância com a gota espessa. Com base na curva ROC (Receiver Operating Characteristic); o teste com as amostras diluída 1/1000 apresentou melhor desempenho, indicando que nessa diluição não haverá ou haverá menos chance de obter resultados falso-positivos. Essa comparação ainda precisa ser melhor analisada, uma vez que esse foi comparado a detecção de anticorpo com a pesquisa de antígeno, e os relatos na literatura ainda são muito restritos.

Na avaliação para analisar a influência da exposição prévia, com a finalidade de estimar o potencial dos anticorpos como biomarcadores de exposição, observamos que em relação à idade, a percentagem de positivos foi similar em todas as faixas analisadas. Esse resultado mostra que os indivíduos adultos podem está mais expostos ou terem um passado com exposições mais frequentes. As repetidas infecções por *Plasmodium* contribuem como reforço para a imunidade humoral (Rosa-Aguierre, 2013). Entretanto, pouco tem sido explorado para investigar se os adultos apresentam maior positividade por terem tido mais episódios no passado ou por exercerem atividades que favorecem a exposição recente à malária.

Nos indivíduos adultos a exposição por períodos mais longos pode contribuir para melhorar a resposta imune, adquirindo proteção que favorece o controle da densidade parasitária ou a diminuição na intensidade dos sintomas clínicos. Atualmente, esta aquisição está melhor avaliada para a malária mais grave, causada por *P. falciparum*, mas existem relatos também para malária causada por *P. vivax* (Alves *et al.*, 2002; Ladeia-Andrade *et al.*, 2009). Estudo realizado com amostras de indivíduos do arquipélago de Vanuatu mostrou que a frequência de soros positivos aumentou com a idade; mas não avaliou aspectos clínicos relacionados à proteção (Cook *et al.*, 2010). Outro estudo realizado na Turquia, mostrou que 85,4% das amostras foram positivas para a pesquisa de anticorpos anti-PvMSP1₁₉ das classes IgM, IgG e IgA, e a subclasse IgG1 foi a primeira a aumentar (83,3%), encontrando-se em níveis elevados em qualquer faixa etária (Zeyrek *et al.*, 2008).

Outro aspecto analisado foi a exposição prévia à malária, verificamos que a percentagem de positivos entre os indivíduos que relataram terem tido pelo menos um episódio de malária variou de 40,4% a 41,3%, e no grupo que relatou nunca ter tido malária a positividade foi significativamente menor (17,2%). Esse aumento na frequência de positivos após exposição tem sido observado em outros estudos (Barbedo *et al.*, 2007; Mourão *et al.*, 2012).

A percentagem de indivíduos positivos que relataram nunca ter tido malária foi similar à observada com amostras coletadas nos municípios de trairão e Itaituba, no estado do Pará, onde a positividade foi em torno de 20% (Leite, 2007). A baixa percentagem de positivos, que não relataram exposição prévia também está de acordo com um estudo realizado na ilha de Cotijuba, Belém, que detectou 6,2% de positivos entre os indivíduos sem histórico de malária (Soares *et al.*, 1999a).

Vários estudos têm relatado casos de malária assintomática ou sub-patente, que são detectados na sorologia e confirmados por PCR (Curado *et al.*, 2006; Suarez-Multi *et al.*, 2007; Silva-Nunes & Ferreira, 2007; Starzengruber *et al.*, 2014). Os portadores assintomáticos podem permanecer como um reservatório de parasitos, sendo a provável fonte de infecção (Alves *et al.*, 2002; Starzengruber *et al.*, 2014). Para esclarecer se há ocorrência de portadores, estudos futuros devem dar continuidade, e uma estratégia poderia ser a utilização dos métodos moleculares e sorológicos, para avaliar se podem ser casos de portadores assintomáticos ou

possível reatividade cruzada na pesquisa de anticorpos. Entretanto, a condição de reatividade cruzada com a MSP1₁₉ ainda não foi descrita na literatura.

Em relação ao tempo de residência na área, nos grupos que relataram residir entre um e quatro anos, a percentagem de positivos foi similar, variando entre 32,4% e 46,2%. Porém, no grupo que residia há mais de cinco anos a frequência de positivos foi significativamente maior (91,7%). Os resultados mostraram que o tempo de residência nesta área de transmissão influenciou a aquisição de anticorpos específicos IgG contra PvMSP1₁₉, indicando que esses indivíduos podem pertencer ao grupo de maior risco, incluindo a atividade ocupacional.

Estudo realizado no Estado de Rondônia, área endêmica de malária, analisou a aquisição de anticorpo anti-PvMSP1 em relação ao tempo de residência, em indivíduos que residiam de 15 a 29 anos ou mais de 30 anos naquela região. Esses indivíduos apresentaram 30 vezes mais chance de adquirir anticorpos anti-PvMSP1 da região N-terminal quando comparado a região C-terminal, mostrando pela primeira vez que a resposta de anticorpos contra a região N-terminal da PvMSP1 dependia do tempo de residência na área endêmica, mas a resposta para a região C-terminal não dependia dessa longa exposição (Nogueira *et al.*, 2006). Assim, podemos inferir que esta diferença pode ser devida a outros fatores epidemiológicos ou imunológicos, que podem influenciar a aquisição de anticorpos específicos que reconhecem a porção C-terminal da MSP1. Estudos futuros são necessários para identificar tais fatores.

Neste estudo podemos concluir que as análises sorológicas confirmaram a alta imunogenicidade da porção C-terminal da Proteína 1 da Superfície do Merozoíto de *P. vivax* (PvMSP1₁₉). Também observamos que há necessidade de padronizar as análises dos dados obtidos no ensaio imunoenzimático (ELISA), visando a sua aplicação em estudos que propõe a detecção dos anticorpos como um biomarcador para monitorar a intensidade de transmissão da malária.

5. CONCLUSÕES

1. As análises dos dados obtidos por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizado para pesquisa de anticorpos IgG, que reconhecem a porção C-terminal da Proteína 1 da Superfície do Merozoíto de *P. vivax* (PvMSP1₁₉), forneceram informações consistentes que mostram a necessidade de padronizar tanto o procedimento técnico (diluição da amostra) quanto a análise qualitativa e quantitativa (valor do ponto de corte e determinação dos níveis séricos de anticorpos).

2. No âmbito da validação desse ensaio para estudos que avaliam o potencial dos anticorpos IgG como biomarcador de exposição, a comparação da pesquisa de anticorpos por ELISA com a pesquisa de parasito pelo exame da gota espessa confirmou a aplicação da sorologia para a detecção de anticorpos, sendo que a positividade foi maior durante a infecção patente.

3. No estudo imuno-epidemiológico, analisamos a aquisição natural de anticorpos anti-MSP1₁₉ de *P. vivax* e, considerando a exposição prévia e o tempo de residência na área, os resultados confirmam a aplicação da sorologia para monitorar a exposição contínua ao parasito, em especial nos estudos relacionados à epidemiologia da transmissão da malária.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. P; DURLACHER, R. R; MENEZES, M. J; KRIEGER, H; SILVA, L. H; CAMARGO, E. P. **High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations.** American Journal of Tropical Medicine Hygiene 66:641-648, 2002.

ANDO, E.S. **Toxina distensora citoletal (CDT): análise da resposta imune humoral em soros de pacientes com diferentes condições periodontais e seu efeito sobre a atividade macrofágica.** São Paulo, 2009. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2009. [Orientador: Marcia Pinto Alves Mayer].

ARÉVALO-HERRERA, M; CHITNIS, C; HERRERA, S. **Current status of *Plasmodium vivax* vaccine.** Human Vaccine, v.6, p.124-132, 2010.

ARRUDA, M.E; ZIMMERMAN, R.H; SOUZA, R.M.C; OLIVEIRA-FERREIRA, J. **Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [online, vol.102, n.3, p. 367-372. Epub 10 de maio de 2007. ISSN 0074-0276.

AYRES, M., JUNIOR, M.A., AYRES, D.L., SANTOS, A.A.S. **BioEstat aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-médicas.** Belém, Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq, 2007.

BAIRD, J.K. **Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, v.48, p.4075-4083, 2004.

BAIRD, J.K. **Neglect of *Plasmodium vivax*.** Trends of Parasitology, v.23, p.533-539, 2007.

BARBEDO, M.B., RICCI, R., JIMENEZ, M.C.S., CUNHA, M.G., YAZDANI, S.S., CHITNIS, C.E., RODRIGUES, M.M., SOARES, I.S. **Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*.** Memórias Instituto Oswaldo Cruz [online], vol. 102, nº 3, p.: 335-339. Epub 10 de maio de 2007. ISSN 0074-0276.

BOUSEMA, T., YOUSSEF, R.M., COOK, J., COX, J., ALEGANA, V.A., AMRAN, J., NOOR, A.M., SNOW, R.W., DRAKELEY, C. **Serologic markers for detecting malaria in areas of low endemicity, Somalia, 2008.** Emerging Infectious Disease Vo, 16, nº 3, p: 392-399, 2010.

BOUSEMA, T; KREUELS, B. AND GOSLING, R. **Adjusting for heterogeneity of malaria transmission in longitudinal studies.** Journal of Infectious Disease Vol. 204: 1-3. 2011.

BRAGA EM, CARVALHO LH, FONTES CJ, KRETTLI AU. **Low cellular response in vitro among subjects with long-term exposure to malaria transmission in**

Brazilian endemic areas. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Vol. 66(3):299–303, 2002.

BRAGA, E.M. **Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1).** PLoS ONE Volu 6: e21289, 2011.

BRASIL Ministério da Saúde, Sistema de Vigilância Epidemiológica da Malária - http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp (acessado 19.04.2014)

_____, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde - <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs> (acessado 13.05.2014)

_____, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Brasília, DF, 2009.

BUENO, L.L. ***Plasmodium vivax*: Efeito na resposta imune inata de antígenos recombinantes, AMA-1 e MSP-119, candidatos a vacina.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas – UFMG. Belo Horizonte. 2008. 80 f.

BUENO, L.L.; LOBO, F.P; MORAIS, C.G; MOURÃO, L.C; DE AVILA, R.A; SOARES, I.S; FONTES, C.J; LACERDA, M.V; OLORTEGUI, C.C; BARTHOLOMEU, D.C; FUJIWARA, R.T; BRAGA, E.M. **Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1).** PLoS ONE 6: e21289, 2011.

COLE-TOBIAN, J.; KING, C. L. **Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene.** Mol. Biochem. Parasitol., v. 127, p. 121-132, 2003.

COOK, J., REID, H., LAVRO, J., KUWAHATA, M., TALEO G., CLEMENTS, A., McCARHTY, J., VALLELY, A., DRAKELEY, C. **Using serological measures to monitor changes in malaria transmission in Vanuatu.** Malaria Journal, Vol,9, 2010.

COX-SINGH, J; DAVIS, T.M; LEE, K.S; SHAMSUL, S.S; MATUSOP, A; RATNAM, S; RAHMAN, H.A; CONWAY, D.J; SINGH, B. ***Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.** Clinical Infectious Disease, Vol. 46: 165-71, 2008.

CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. **Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors.** Vaccine. Vol. 20, nº 3-4, p. 385–96, 2001.

CUNHA, M.G., RODRIGUES, M.M., SOARES, I.S. **Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP119 expressed in distinct bacterial vectors.** Vaccine, Vol. 20, p.: 385-396, 2002.

CUNHA, MG. SILVA, E.S., SEPÚLVEDA, N., COSTA, S.P.T. SABOIA, T.C., GUERREIRO, J.F, PÓVOA, M.M., CORRAN, P.H., RILEY, E., DRAKELEY, C.J. **Serologically Defined Variations in Malaria Endemicity in Pará State, Brazil**, PLoS One, Vol. 9(11): e113357.

CUTTS, J.C., POWELL, R., AGIUS, P.A., BEESON, J.G., SIMPSON, J.A., FOWKES, F.J.I. **Immunological markers of *Plasmodium vivax* exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis**. BMC Medicine, Vol. 12, p.120, 2014 .

DACUMA, M.G., DIMALIBOT, J., YADAO, F., YASAÑA, A., BONA, E., NOTARI, W., HALLET, R. **Estimating malaria transmission in Sarangani Province, the Philippines using serological markers of infection**. Malaria Journal, Vol. 11(Supl 1), p. 20, 2012.

DE CASTRO, M. C; MONTE-MOR, R. L; SAWYER, D. O; SINGER, B. H. **Malaria risk on the Amazon frontier**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 103:2452-2457, 2006.

DODERER, C; HESCHUNG, A; GUNTZ, P, CAZENAVE, JP; HANSMANN, Y; SENEGAS, A; PFAFF, AW; ABDELRAHMAN, T; CANDOLFI, E. **A new ELISA kit which uses a combination of *Plasmodium falciparum* extract and recombinant *Plasmodium vivax* antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies**. Malaria Journal, Vol.6:19, 2007.

DRAKELEY, C.J., CORRAN, P.H., COLEMAN, P.G., TONGREN, J.E., MCDONALD, S.L.R., CARNEIRO, I., MALIMA, R., LUSINGU, J., MANJURANO, A., NKYA, W.M.M, LEMNGE, M.M., COX, J., REYBURN, H., RILEY, E.M., **Estimating medium- and long –term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, Vol. 102: 5108-5113, 2005.

GENTON, B., D'ACREMONT, V., RARE, L., BAEA, K., REEDER, J. C., ALPERS, M. P., MÜLLER, I. ***Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea**. PLoS Medicine. Vol. 5, nº. 6, p. e127, 2008.

GREINER, M. **Two-graph receiver operating characteristics (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut off values in diagnostic tests**. Journal of Immunological Methods, Vol. 185(1):145-6, 1995.

GUPTA, S; SNOW, R.W; DONNELLY, C.A; MARSH, K; NEWBOLD, C. **Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections**. Nature Medicine, Vol. 5(3): 340-343. 1999.

KING, C. L.; MICHON, P.; SHAKRI, A. R.; MARCOTTY, A.; STANISC, D.; ZIMMERMAN, P. A.; COLE-TOBIAN, J. L.; MUELLER, I.; CHITNIS, C. E. **Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, Vol. 105: 8363-8368, 2008.

KOCHAR, D. K., DAS, A., KOCHAR, S. K., SAXENA, V., SIROHI, P., GARG, S., KOCHAR, A., KHATRI, M. P., GUPTA, V. **Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India.** American Journal of Medicine and Hygiene, Vol. 80, nº. 2, p.194-8, 2009.

LADEIA-ANDRADE, S; FERREIRA, M.U; SCOPEL, K.K; BRAGA, E.M; BASTOS, M.D.A.S; WUNDERLICH, G; COURA JR. **Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1(19) and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [online], Vol. 102, p.943-951, 2007.

LEE, K.S; COX-SINGH, J; SINGH, B. **Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections.** Malaria Journal, Vol. 8: 73, 2009.

LIM, K.J., PARK, J.W., YEOM, J.S., LEE, Y.H., YOO, S.B., OH., BAHK, Y.Y., KIM, Y.S. **Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to *Plasmodium vivax*.** Parasitology Research, Vol. 92: 384-9, 2004.

LIMA-JUNIOR, J.C., ET AL. **Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals.** Vaccine, Vol. 26 (51), 6645–6654, 2008.

_____. **Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the *Plasmodium vivax* MSP-1, MSP-3alpha and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area.** PLoS One, Vol. 7 (5), e36419, 2012.

LUCHAVEZ, J; ESPINO, F; CURAMENG, P; ESPINA, R; BELL, D; ET AL. **Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philipines.** Emerging Infectious Diseases 14: 811–813, 2008.

MORAIS, C.G., SOARES, I.S., CARVALHO, L.H., FONTES, C.J.F., KRETTLI, A.U., BRAGA, E.M. **Antibodies to *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Vol. 75: 582-587, 2006.

MOURÃO, L.C., MORAIS, C.G., BUENO, L.L., JIMENEZ, M.C., SOARES, I.S., FONTES, C.J., LACERDA, M.V.G., XAVIER, M.S., BARNWELL, J.W., GALINSKI, M.R., BRAGA, E.M. **Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* blood-stage vaccine candidates (PvMSP-119 and PvMSP3α359-798) and their relationship with hematological features in malaria patients from the Brazilian Amazon.** Microbes and Infections, Vol. 14: 730-739, 2012.

MUELLER, I; ZIMMERMAN, P.A; REEDER, J.C. ***Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* – the ‘bashful’ malaria parasites.** Trends of Parasitology, Vol. 23(6): 278- 283, 2008.

NG, O.T; OOI, E.E; LEE, C.C; LEE, P.J; NG, L.C., WONG, P.S; TU, T.M; LOH, J.P. & LEO, Y.S. **Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore.** Emerging Infectious Disease, Vol 14(5): 814-816, 2008.

NOGUEIRA, P.A., ALVES, F.P., FERNANDEZ-BECERRA, C., PEIN, O., SANTOS, N.R., PEREIRA DA SILVA, L.H., CAMARGO, E.P., DEL PORTILLO, H.A. **A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of Merozoite Surface Protein 1.** Infectious Immunology Journal, Vol. 74, 2006.

OH, J.S; KIM, J.S; LEE, C.H; DEOK HWA NAM, D.H; KIM, S.H; PARKER, D.W; LEE, C.K; LIM, C.S; GIL HONG PARK, G.H. **Evaluation of a malaria antibody enzyme immunoassay for use in blood screening.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [online], Vol. 103, nº 1: 75-78, 2008.

OLIVEIRA-FERREIRA J, LACERDA MV, BRASIL P, LADISLAU JL, TAUIL PL, DANIEL-RIBEIRO CT. **Malaria in Brazil: an overview.** Malaria Journal, Vol 9: 15, 2010.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Malaria in the Americas: time series epidemiological data from 2000 to 2007.** Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=19209&Itemid=270&lang=en. Acessado em 12 de dez. de 2012.

PANDEY, J.P., MORAIS, C.G., FONTES, C.J.F., BRAGA, E.M. **Immunoglobulin GM 3, 23 5, 13, 14 phenotype is strongly associated with IgG1 antibody responses to *Plasmodium vivax* vaccine candidate antigens PvMSP119 and PvAMA-1.** Malaria Journal, Vol. 9: 229, 2010.

PEREZ, HA; DE LA ROSA, M. **El inmunoensayo enzimático (ELISA) em El diagnóstico sorológico de *Plasmodium vivax*.** Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo, Vol. 32 (3): 189-195, 1990.

REY, L. **Parasitologia.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001.

RODRIGUES, M. H.; CUNHA, M. G.; MACHADO, R. L.; FERREIRA JR, O. C.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. **Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the Merozoite Surface Protein-1.** Malaria Journal, Vol.2, nº. 1, p. 39, 2003.

ROTA, M.C., MASSARI, M., GABUTTI, G., GUIDO, M., DE DONNO, A., ATTI, M.L.C.D. **Measles serological survey in the Italian population: Interpretation of results using mixture model.** Vaccine Vol. 26: 4403-4409, 2008.

NOGUEIRA, P.A., ALVES, F.P., FERNANDEZ-BECERRA, C., PEIN, O., SANTOS, N.R., PEREIRA DA SILVA, L.H., CAMARGO, E.P., DEL PORTILLO, H.A. **A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of Merozoite Surface Protein 1.** Infect Immunology Journal 74, 2006.

SACHS, J; MALANEY, P. **The economics and social burden of malaria.** Nature, Vol. 415: 680 – 685, 2002.

SAWYER, D. **Economic and social consequences of malaria in new colonization projects in Brazil.** Society of Scientific Medicine, Vol. 37:1131-1136, 1993.

SOARES, I.S., LEVITUS, G., SOUZA, J.M., DEL PORTILLO, H.A., RODRIGUES, M.M. **Acquired immune response to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria.** Infectious Immunology, Vol. 65:1606-1614, 1997.

SOARES, I.S., OLIVEIRA, S., SOUZA, J.M., RODRIGUES, M.M. **Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* in the north of Brazil.** Acta Tropica 72: 13- 24, 1999a.

SOARES, I.S., CUNHA, M.G., SILVA, M.N., SOUZA, J.M., DEL POLTILLO, H.A, RODRIGUES, M.R. **Longevity of naturally acquired antibody response to the N- and C- terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Vol. 60: 357-363, 1999b.

STEVENSON, M.M., RILEY, E.M. **Innate immunity to malaria.** Nature Reviews of Immunology, Vol. 4, p.169-180,2004.

STORTI-MELO, L. M; COSTA, D. R.; SOUZA-NEIRAS, W. C; CASSIANO, G. C.; COUTO, V. S. C.A; POVOA, M. M; SOARES, I. S; CARVALHO, L. H; AREVALO-HERRERA, M; HERRERA, S; ROSSIT, A. R. B; CORDEIRO, J. A; MATTOS, L. C.; MACHADO, R. L. M. **Influence of HLA-DRB-1 alleles on the production of antibody against CSP, MSP-1, AMA-1, and DBP in Brazilian individuals naturally infected with *Plasmodium vivax*.** Acta Tropica, Vol. 121: 152–155, 2012.

TANGPUKDEE, N; DUANGDEE, C; WILAIRATANA, P; KRUDSOOD, S. **Malaria Diagnosis: A Brief Review.** Korean Journal of Parasitology, Vol. 47, nº. 2: 93-102, 2009.

TJITRA, E., ANSTEY, N. M., SUGIARTO, P., WARIKAR, N., KENANGALEM, E., KARYANA, M., LAMPAH, D. A., PRICE, R. N. **Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia.** PLoS Medicine, Vol. 5, nº 6, p. e128, 2008.

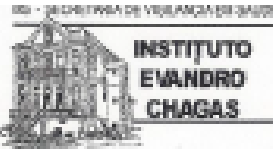
VYSE, A.J., GAY, N.J., HESKETH, L.M., PEBODY, R., MORGAN-CAPNER, P., MILLER, E. **Interpreting serological surveys using mixture models: the seroepidemiology of measles, mumps and rubella in England and Wales at the beginning of the 21st century.** Epidemiology Infection vol. 134: 1303 – 1312, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report 2013**, Geneva, Switzerland, 2013.

YIDEZ -ZEYREK, Y. F; PALACPAC, N; YUKSEL, F; YAGI, M; HONJO, K; FUJITA, Y; ARISUE, N; TAKEO, S; TANABE, K; HORII, T; TSUBOI, T; ISHII, K.J; COBAN, C. **Serologic markers in relation to parasite exposure history help to estimate transmission dynamics of *Plasmodium vivax*.** PLoS One, Vol. 6:e28126, 2011.

ANEXOS

ANEXO I



Parecer de Aprovação nº 0031/2010
Protocolo CEP/IEC - Nº 0014/10
CAAE: 0014.0.072.000-10

Ananindeua/PA, 15 de outubro de 2010.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: "Rede Paraense malária"

Pesquisador Responsável: MARINETE MARINS POVOA

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, certificamos que o projeto em epígrafe foi considerado aprovado.

Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

Atenciosamente,


MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC

ANEXO II

CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE

1. Título do Subprojeto: Avaliação dos aspectos da resposta de anticorpos adquirida contra antígenos da fase sanguínea.

2. Instituição onde será desenvolvido o Subprojeto: Universidade Federal do Pará (UFPA)

3. Objetivo: Realizar estudos sobre a transmissão da malária, no município de Goianésia do Pará.

4. Procedimentos: Serão coletados 10-15 mL de sangue venoso em tubo a vácuo. Todo o material utilizado na coleta é descartável e você não será submetido a qualquer risco.

5. Benefícios: A realização desse estudo irá contribuir para aumentar o conhecimento sobre o que ocorre no organismo de uma pessoa, quando ela foi exposta ao parasito que causa a malária.

6. Ética: Sua participação neste estudo será sigilosa e, portanto, seu nome não será utilizado em nenhuma etapa da divulgação dos resultados desta pesquisa. Você poderá desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento. Além disso, você será esclarecido sobre qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento da sua doença. Também será apresentada uma carta de esclarecimento sobre o estudo e os procedimentos envolvidos, que será lida para você, e caso concorde em participar, você deve assinar para confirmar sua participação e o entendimento dessa pesquisa em malária.

ANEXO III
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A malária é uma doença transmitida pela picada do mosquito e seus principais sintomas são calafrio, febre e suor. A finalidade desse estudo é avaliar o que ocorre no organismo de um indivíduo com malária, contribuindo para o conhecimento sobre essa doença. A realização deste estudo precisa da participação de pessoas que residem em área onde ocorre malária. Você será esclarecido sobre qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento da sua doença. Todo o material utilizado na coleta é descartável. Serão coletados 10-15 mL de sangue, e durante este procedimento, você não será submetido a nenhum risco. **A sua participação será sigilosa, o seu nome não será mostrado. Você poderá desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento.** Se desejar obter mais informações ou esclarecer qualquer dúvida, pode entrar em contato com a responsável, professora Maristela Gomes da Cunha, na Universidade Federal do Pará ou pelo telefone (91) 3201-7565. Após a leitura e explicações, entendi, não tenho dúvidas e concordei voluntariamente em participar desse estudo.

NOME:

DATA:

RG:

ASSINATURA:

Confirmando ter explicado a natureza e objetivos deste estudo ao paciente acima,

NOME:

RG:

DATA:

ASSINATURA

ANEXO IV
FICHA EPIDEMIOLÓGICA

Título do projeto:

Nº da amostra:.....Data:.....

Resultado do exame - parasitemia e espécie:

Nome:.....

Sexo: () F () M Idade:..... Local de Nascimento.....

Endereço

Quanto tempo mora neste endereço (meses)?

Quanto tempo mora na área endêmica (meses)?

Viajou nos últimos 30 dias (local)?.....

Local de provável infecção.....

Usa alguma proteção individual? () Sim () Não

Se sim, quais (1-mosquiteiro, 2-repelente, 3-quimioprofilaxia, 4-outros)?.....

Quantas malárias já teve?.....Qual (quais) espécie (s)?.....

Tempo da última malária (meses):..... Espécie (s):

Foi hospitalizado durante alguma malária?.....

Doenças tropicais: () Leishmaniose () Doença de Chagas () Toxoplasmose

Já fez transfusão de sangue () Sim () Não Quantas?

Está tomando medicamento?

História clínica atual (1-febre, 2-cefaléia, 3-calafrios, 4-náuseas, 5-mialgia, 6-
(outros).....Início dos sintomas.....

Temperatura corporal:Tipo sanguíneo (ABO/Rh):.....

Se mulher, está grávida? () Sim () Não

Observações: