

TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO NA SOROLOGIA DA MALÁRIA HUMANA EMPREGANDO HEMÁCIAS PARASITADAS PELO *PLASMODIUM BERGHEI*

Maria Carmen Arroyo Sanchez-Ruiz, Mário E. Camargo, Antonio Carlos Ceneviva e Antonio Walter Ferreira

Foi padronizado um teste de hemaglutinação para a sorologia da malária humana, com reagente constituído de suspensão de hemácias de camundongos infectadas pelo Plasmodium berghei e preservadas por fixação aldeídica. Em pacientes com parasitemia por P. falciparum ou P. vivax obteve-se uma sensibilidade de 98,9% nos 88 casos estudados, o teste apresentando títulos entre 40 e 640. Para o grupo de 476 soros de indivíduos não-maláricos, obteve-se uma especificidade de 96,0%. O teste apresentou elevada reprodutibilidade, mesmo para diferentes lotes de antígenos. Nos 200 soros, obtidos ao acaso, de indivíduos de área endêmica, o teste apresentou positividade de 48,5%, contra 88,0% do teste de imunofluorescência-IgG. A baixa positividade pode ser devida a que o teste de hemaglutinação detecta anticorpos IgM. Após tratamento com 2-mercaptoetanol, todos os soros de pacientes com parasitemia tornaram-se não reagentes. Em relação ao teste de imunofluorescência-IgG, o teste de hemaglutinação apresentou índice de co-positividade de 0,989 para os soros de maláricos com parasitemia. Para os soros de não-maláricos o teste de hemaglutinação apresentou índice de co-negatividade de 0,969. Por outro lado, no grupo de soros de área endêmica, o índice de co-positividade foi de 0,528 e o de co-negatividade, de 0,833.

Palavras chaves: Malária. *Plasmodium berghei*. Sorologia. Imunodiagnóstico. Hemaglutinação.

A malária representa um dos mais sérios problemas de saúde pública no Brasil, principalmente na zona equatorial, embora tenha sido erradicada das áreas de maior densidade demográfica e de maior desenvolvimento sócio-econômico.

O método clássico para o diagnóstico da malária consiste na pesquisa de plasmódios em extensões ou gotas de sangue. Porém o exame microscópico apresenta limitações, pois indica apenas a presença ou não de parasitemia; podem ocorrer resultados negativos falsos, visto que a patência é influenciada pelo estado imune do indivíduo e por ação de drogas antimaláricas utilizadas na profilaxia ou na terapia¹⁵. Para estudos epidemiológicos, as limitações da pesquisa direta são maiores, pois o exame é demorado, requer pessoal

experimentado e pode não ser preciso, principalmente quando se examina grande número de amostras com baixa parasitemia¹⁷.

Os testes sorológicos têm sido utilizados como métodos complementares ao exame microscópico tradicional, apresentando grande importância em estudos soroepidemiológicos e no diagnóstico individual da malária¹⁵.

Vários testes sorológicos têm sido empregados na pesquisa de antígenos ou anticorpos na malária humana. As reações de imunofluorescência²⁶, enzimaimunoensaio²⁰ e radioimunoensaio¹ podem apresentar grande sensibilidade e especificidade quando são empregados sistemas homólogos, porém requerem reagentes e material muitas vezes inacessíveis à maioria dos laboratórios. O desenvolvimento de testes sorológicos que apresentem alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, sendo ao mesmo tempo, de fácil e rápida execução e de baixo custo, apresenta grande importância soroepidemiológica.

Devido à ocorrência de reações cruzadas entre diferentes plasmódios, vêm sendo empregados como

Laboratório de Sorologia e Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, São Paulo, SP.

Trabalho apresentado ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Grau de Mestre em Análises Clínicas.

Recebido para publicação em 1º/8/84.

antígenos nos testes sorológicos para a malária humana, além das espécies que infectam o homem, plasmódios de outros animais como o *P. gallinaceum*^{12 14 27} e o *P. berghei*^{2 4 5 18}. Ceneviva e Camargo⁸ padronizaram o teste de hemaglutinação com hemácias de aves infectadas pelo *P. gallinaceum*, demonstrando alta sensibilidade e boa especificidade em pacientes com malária por *P. vivax* ou *P. falciparum* e em indivíduos aparentemente normais. O *P. berghei* vem sendo utilizado como antígeno nas reações de imunofluorescência indireta^{2 9 11 18}, de aglutinação do látex⁴ e de hemaglutinação passiva⁵, tendo sido o seu emprego recomendado tanto para fins de diagnóstico¹¹ como para estudos epidemiológicos¹⁸.

No presente trabalho, foi padronizado o teste de hemaglutinação com hemácias de camundongos parasitados pelo *P. berghei*. Foram estudadas as condições do preparo do reagente e da realização do teste, avaliando-se sua especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade. Foram comparados os resultados com os verificados pelos testes de hemaglutinação com *P. gallinaceum* e de imunofluorescência indireta com *P. falciparum* e *P. vivax*.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros-padrão

No estudo da padronização do reagente, empregaram-se soros-padrão positivos, obtidos de pacientes com parasitemia por *P. falciparum* ou por *P. vivax*, todos reagentes pelo teste de imunofluorescência indireta. Empregaram-se, também, soros-padrão negativos, obtidos de indivíduos residentes em região indene.

Casística

Empregaram-se 288 amostras de soros de residentes na região amazônica, em áreas com surtos de malária, 44 com parasitemia por *P. falciparum*, 44 por *P. vivax* e os 200 restantes sem confirmação clínica, colhidos ao acaso, entre indivíduos não-maláricos, com malária atual e malária pregressa. Obtiveram-se, ainda, 476 amostras de soros de pessoas residentes em São Paulo, incluindo doadores de banco de sangue, pacientes de laboratório clínico e pacientes com diferentes processos infecciosos. Todas as amostras de soros foram conservadas a -20°C, após adição de glicerina p.a., volume a volume.

Plasmodium berghei

A cepa de *P. berghei*, gentilmente fornecida pelo Dr. G. Chaia, do Departamento Experimental da Johnson & Johnson, em 1979, vem sendo mantida aciclicamente no laboratório. Para esse fim, camundongos 'Swiss', pesando de 20 a 25 g, foram inoculados, intraperitonealmente, com 0,2 ml de sangue total heparinizado e diluído para obtenção de número de hemácias parasitadas correspondente a parasitemia de 4%. Quando o grau de parasitemia se elevou acima de 20% (entre o 8º e o 15º dia de infecção), os animais foram sangrados por punção cardíaca. O sangue assim obtido foi empregado no estudo da padronização e preparo do reagente para o teste de hemaglutinação.

Preparo de reagente

Sangue heparinizado e recentemente colhido foi centrifugado a 1500 xg, durante 10 minutos, para separação do plasma e do creme leucocitário. As hemácias foram lavadas por quatro vezes com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) (0,01 M, pH 7,2) e suspensas a 10% em PBS (NaCl 0,15 M, fosfatos 0,15 M, pH 7,6). A seguir adicionou-se igual volume de formaldeído diluído a 5,6% em PBS (NaCl 0,15 M, fosfatos 0,15 M, pH 7,6) para uma concentração final de 2,8%. Após incubação a 37°C durante 18 horas, com agitação periódica, as células foram lavadas por quatro vezes com PBS (0,01 M, pH 7,2). O sedimento de hemácias formolizadas foi suspenso a 4,5% em solução diluente preparada com PBS (NaCl 0,075 M, fosfatos 0,075 M, pH 6,4) contendo 4% de glicina, 2,7% de leite em pó desnatado, 0,2% de glutamato de sódio, 0,1% de tioglicolato de sódio e 0,1% de azida sódica¹³. O reagente obtido foi conservado a 4°C, em suspensão, ou liofilizado.

Teste de hemaglutinação com antígeno de *P. berghei* (HAb)

O teste HAb foi desenvolvido em placas de poliestireno com cavidades em V, empregando-se 50 µl de cada diluição do soro e 25 µl do reagente de hemácias a 1,5%. Os soros foram diluídos em solução salina (NaCl 0,15 M) a partir da diluição inicial de 1:10, empregando-se razão 2. As placas, após homogeneização, foram incubadas na temperatura ambiente, em câmara úmida, durante uma a duas horas. Os títulos dos soros foram expressos como o inverso da maior diluição em que se observava a formação de 'tapete'. Consideraram-se significativos títulos iguais ou superiores a 40. Incluíram-se sempre soros-padrão posi-

tivos, soros-padrão negativos e testemunha do antígeno, feito na ausência de soros.

Teste de hemaglutinação com antígeno de *P. gallinaceum* (HAg)

O teste HAg foi executado conforme técnica descrita por Ceneviva e Camargo⁸.

Teste de imunofluorescência

Para o preparo dos antígenos de *P. falciparum* e de *P. vivax* e execução dos testes, empregou-se a metodologia descrita por Sulzer e cols.²⁶, utilizando-se sangue de indivíduos com primoinfecção recente e parasitemia elevada. Para o *P. falciparum*, o parasito foi amadurecido a esquizontes, segundo Lopez-Antuñano¹⁶. Os testes foram executados empregando-se conjugados anti-IgG e anti-IgM. O conjugado anti-IgG foi preparado no Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; o conjugado anti-IgM foi obtido comercialmente (Hyland-Travenol).

Análise estatística dos resultados

As médias geométricas dos títulos foram cal-

culadas segundo método descrito por White²⁸, utilizando-se títulos codificados. A significância da diferença entre médias geométricas de títulos foi verificada pelo teste "t" de Student de amostras pareadas²⁸. A correlação entre títulos obtidos foi determinada calculando-se o coeficiente de correlação linear de Pearson²⁵.

RESULTADOS

Sensibilidade do teste HAb

Os 44 soros de indivíduos com parasitemia por *P. vivax* apresentaram títulos que oscilaram entre 40 e 320. Com os 44 soros de indivíduos com malária por *P. falciparum* obtiveram-se títulos variando entre 20 e 640. A Tabela 1 apresenta a distribuição dos títulos obtidos nos 88 soros estudados. O teste apresentou sensibilidade de 98,9% (L. C. 95% = 93,9 - 100,0), para títulos iguais ou superiores a 40.

Após tratamento com 2-mercaptoetanol¹⁰, os soros que apresentavam títulos variando entre 40 e 640, tornaram-se não reagentes pelo teste HAb, embora os títulos pela imunofluorescência com conjugado anti-IgG tenham permanecido inalterados.

Tabela 1 - Frequência e média geométrica dos títulos (MGT) obtidos pelo teste HAb para soros de 88 indivíduos com parasitemia.

Espécie infectante	Títulos						MGT
	20	40	80	160	320	640	
<i>P. falciparum</i>	1	6	13	14	8	2	214
<i>P. vivax</i>	0	6	19	13	6	0	108
Total	1	12	32	27	14	2	116

Especificidade do teste HAb

A especificidade do teste HAb foi de 96,0% (L. C. 95% = 93,8 - 97,6), em soros diluídos a 1/40, no grupo de 476 soros estudados. A Tabela 2 apresenta a frequência de títulos observados.

Reprodutibilidade do teste HAb

Em testes realizados em triplicata, no mesmo dia, e com o mesmo reagente frente a 30 soros-con-

trole, obtiveram-se variações de uma diluição em 11 (37%) dos soros e concordância total em 19 (63%). Em testes realizados no mesmo dia, empregando-se dois lotes de reagentes, obteve-se variação de uma diluição ou menos em 29 (97%) dos soros. Obteve-se variação de duas diluições em apenas um dos 30 soros testados. Testando-se sete lotes de reagentes preparados em dias diferentes, frente a um mesmo padrão positivo, obtiveram-se títulos de 160 a 640, sendo mais frequentes o título de 320.

Tabela 2 – Teste HAb: Frequência de títulos e porcentagem de soros não reagentes, com limites de confiança de 95% de probabilidade, obtidos em 476 soros.

Soros	Nº	Títulos						% de soros não-reagentes	
		< 10	10	20	40	80	160	< 40	(L. C. 95%)
doadores de sangue	200	141	21	35	2	1	–	98,5	(96,0 – 98,7)
laboratório clínico	94	92	1	1	–	–	–	100,0	(96,2 – 100,0)
pacientes com: sífilis	24	16	2	3	3	–	–	87,5	(67,6 – 97,3)
mononucleose	31	18	1	8	1	1	2	87,1	(70,2 – 96,4)
paracoccidiodomicose	20	10	2	7	1	–	–	95,0	(75,1 – 99,9)
toxoplasmose	31	24	2	3	–	2	–	93,5	(78,6 – 99,2)
doença de Chagas crônica	33	25	5	3	–	–	–	100,0	(89,4 – 100,0)
doença de Chagas aguda	4	–	–	2	–	–	2	50,0	(6,8 – 93,2)
leishmaniose visceral	9	7	–	1	1	–	–	88,9	(51,8 – 99,7)
leishmaniose tegumentar	30	17	4	6	–	2	1	90,0	(73,5 – 97,9)
Total	476	350	38	69	8	6	5	96,0	(93,8 – 97,6)

Aplicação do teste HAb a soros de área endêmica

Em soros de 200 indivíduos residentes em área endêmica, colhidos ao acaso, o teste HAb apresentou positividade de 48,5% (L. C. 95% = 41,4 – 55,6), com títulos variando entre 40 e 640.

Resultados comparativos com outros testes

Os soros empregados no estudo de sensibilidade e especificidade do teste HAb, bem como os de área endêmica, foram, concomitantemente, submetidos a testes de imunofluorescência indireta, com antígenos

de *P. falciparum* e de *P. vivax*, e de hemaglutinação com antígeno de *P. gallinaceum* (HAg).

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos em soros de indivíduos maláricos com parasitemia. Neste grupo de soros, os testes HAb e HAg apresentaram a mesma sensibilidade (98,9%), com índice de concordância de 0,977 (Tabela 4). Os títulos obtidos no teste HAb foram significativamente mais elevados que os encontrados no teste HAg ($t = 18,11$; graus de liberdade = 87; $p < 0,001$). O coeficiente de correlação linear de Pearson, $r = 0,61$ ($t = 7,14$; graus de liberdade = 86, $p < 0,001$), revelou a existência de alto grau de correlação linear entre os títulos de ambos os testes.

Tabela 3 – Sensibilidade dos testes de imunofluorescência e de hemaglutinação, com limites de confiança de 95% e médias geométricas de títulos (MGT), em soros de 88 maláricos com parasitemia.

Testes	Sensibilidade % (L. C. 95%)	MGT
Imunofluorescência:		
IgG com <i>P. falciparum</i> (IFfG)	90,9 (82,9 – 96,0)	237
IgG com <i>P. vivax</i> (IFvG)	94,3 (87,2 – 98,1)	161
IgM com <i>P. falciparum</i> (IFfM)	37,5 (27,4 – 48,5)	20
IgM com <i>P. vivax</i> (IFvM)	81,8 (72,2 – 89,2)	35
IFfG + IFvG	98,9 (93,8 – 100,0)	–
IFfM + IFvM	81,8 (72,2 – 89,2)	–
Hemaglutinação:		
com <i>P. berghei</i> (HAb)	98,9 (93,8 – 100,0)	116
com <i>P. gallinaceum</i> (HAg)	98,9 (93,8 – 100,0)	28

Tabela 4 – Resultados comparativos dos testes de hemaglutinação com antígeno de *P. berghei* (HAb) ou de *P. gallinaceum* (HAg), em soros de 88 maláricos com parasitemia.

Teste HAg	Teste HAb		
	Reagentes ≥ 40	Não reagentes	Total
Reagentes ≥ 10	86	1	87
Não reagentes	1	0	1
Total	87	1	88

Para o teste de imunofluorescência com conjugado anti-IgG, obteve-se sensibilidade de 98,9% (L. C. 95% = 93,8 – 100,0), quando utilizados antígenos de *P. falciparum* e de *P. vivax*. O índice de concordância verificado entre os testes HAb e de imunofluorescência-IgG e entre os testes HAg e de imunofluorescência-IgG foi, em ambos os casos, de 0,977.

Dos 476 soros empregados na verificação da especificidade do teste HAb, 20 soros foram reagentes pelo teste HAg, o que corresponde a uma especificidade de 95,9% (L. C. 95% = 93,7 – 97,5) para este último teste. O índice de concordância entre os testes foi de 0,960.

A especificidade do teste de imunofluorescência-IgG foi, neste grupo de soros, de 97,5% (L. C. 95% = 95,6 – 98,7), com antígeno de *P. falciparum* e de 99,2% (L. C. 95% = 98,0 – 99,6), com antígeno de

P. vivax. Os índices de concordância observados entre o teste de imunofluorescência-IgG e os testes HAb e HAg foram 0,952 e 0,945, respectivamente.

Os resultados obtidos com soros de residentes em área endêmica, utilizando os testes de imunofluorescência e de hemaglutinação estão na Tabela 5. Neste grupo, a positividade dos testes de hemaglutinação foi de 48,5% (L. C. 95% = 41,4 – 55,6), para o teste HAb e de 37,0% (L. C. 95% = 30,3 – 44,1), para o HAg, com índice de concordância de 0,765. Os títulos obtidos no teste HAb foram significativamente mais elevados que os encontrados no teste HAg ($t = 17,35$; graus de liberdade = 199; $p < 0,001$). O coeficiente de correlação linear de Pearson, $r = 0,61$ ($t = 10,81$; graus de liberdade = 198, $p < 0,001$), indicou a existência de elevado grau de correlação linear entre os títulos obtidos por ambos os testes.

Tabela 5 – Porcentagens de positividade, com limites de confiança de 95%, e médias geométricas de títulos para testes de hemaglutinação e de imunofluorescência em soros de 200 residentes em área endêmica.

Testes	Positividade (%) (L. C. 95%)	MGT*	MGTP**
Imunofluorescência:			
IgG com <i>P. falciparum</i> (IFfG)	80,5 (73,8 – 85,3)	117	213
IgG com <i>P. vivax</i> (IFvG)	73,5 (67,3 – 79,9)	67	133
IgM com <i>P. falciparum</i> (IFfM)	12,0 (7,9 – 17,4)	12	50
IgM com <i>P. vivax</i> (IFvM)	10,5 (6,6 – 15,6)	12	44
IFfG + IFvG	88,0 (82,7 – 92,1)	–	–
IFfM + IFvM	15,5 (10,8 – 21,3)	–	–
Hemaglutinação:			
com <i>P. berghei</i> (HAb)	48,5 (41,4 – 55,6)	29	88
com <i>P. gallinaceum</i> (HAg)	37,0 (30,3 – 44,1)	8	21
HAb + HAg	55,0 (47,8 – 62,0)	–	–

MGT* – Média geométrica de títulos.

MGTP** – Média geométrica de títulos de casos reagentes.

Para o teste de imunofluorescência com conjugado anti-IgG, observou-se positividade de 88,0% (L. C. 95% = 82,7 – 92,1), utilizando-se antígenos de *P. falciparum* e de *P. vivax*. Os índices de concordância entre o teste de imunofluorescência-IgG e os testes HAb e HA_g foram 0,565 e 0,490 respectivamente.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, desenvolveu-se um teste de hemaglutinação para a sorologia da malária humana, com reagente constituído de suspensão de hemácias de camundongos infectados pelo *P. berghei* e preservadas por fixação aldeídica. Foram determinadas diferentes condições para a obtenção de reagente sensível e estável, permitindo leitura nítida de soros reagentes e não-reagentes.

Com relação à fixação aldeídica das hemácias, observaram-se resultados mais homogêneos quando se utilizou tampão fosfato 0,15 M de pH 7,6 e concentração final de formaldeído de 2,8%. Como diluente das hemácias formalizadas, empregou-se a solução preparada segundo Hoshino-Shimizu¹³, estudando-se variações quanto ao conservante e quanto à molaridade e ao pH do tampão fosfato empregado. Obtiveram-se bons resultados com tampão fosfato 0,075 M de pH 6,4 e azida sódica. Nestas condições, o reagente mostrou-se estável, sem fenômenos de auto-aglutinação, apresentando reação de fácil leitura e títulos mais elevados.

O reagente padronizado apresentou, no período de dez meses em que foi estudado, boa estabilidade, não revelando quaisquer alterações, quando conservado a 4°C, em suspensão, ou na temperatura ambiente, quando liofilizado.

O teste de hemaglutinação com *P. berghei* (HAb), aplicado a soros de 88 maláricos com parasitemia apresentou sensibilidade de 98,9% (L. C. 95% = 93,9 – 100,0), para títulos iguais ou superiores a 40. Um único soro foi não-reagente, pois apresentava título inferior a 40. Esse soro pertencia a paciente com primoinfecção por *P. falciparum* e era não-reagente nos testes de imunofluorescência-IgM, com ambos os plasmódios, embora reagisse a 1/20 com *P. vivax* no teste de imunofluorescência-IgG e a 1/10 no teste de hemaglutinação com *P. gallinaceum* (HA_g). O teste HAb mostrou igual sensibilidade à dos testes de imunofluorescência-IgG e à do teste HA_g (98,9%), havendo elevada concordância entre eles. Compa-

rando-se os títulos obtidos nos testes HAb e HA_g, observaram-se valores significativamente mais elevados no teste HAb, havendo alto grau de correlação linear entre os títulos de ambos os testes ($r = 0,61$; $p < 0,001$).

Para os testes de imunofluorescência, empregaram-se antígenos obtidos a partir de sangue de indivíduos com parasitemia. Embora esses antígenos tenham se mostrado adequados para a pesquisa de anticorpos IgG, o mesmo não ocorreu para anticorpos IgM, como pode ser verificado pela baixa sensibilidade encontrada nos testes de imunofluorescência-IgM, que foi de 37,5% (L. C. 95% = 27,4 – 48,5) para o antígeno de *P. falciparum* e de 81,8% (L. C. 95% = 72,2 – 89,2) para o de *P. vivax*. Para a pesquisa de anticorpos IgM, em testes de imunofluorescência, antígenos de *P. falciparum* obtidos de cultivo *in vitro* mostraram ser adequados⁷. Em relação ao teste de imunofluorescência-IgG, considerado teste de referência na sorologia da malária, os testes HAb e HA_g apresentaram índice de co-positividade de 0,989.

A especificidade do teste HAb foi de 96,0% (L. C. 95% = 93,8 – 97,6), em soros diluídos a 1/40, no grupo de 476 soros. Foram reagentes soros de três doadores de sangue e de 16 pessoas com outras infecções. Em casos de doença de Chagas aguda e de mononucleose, obtiveram-se títulos de até 160, devido à presença de anticorpos heterófilos. Porém, essa inespecificidade do teste para anticorpos heterófilos pode ser detectada empregando-se um reagente-testemunha, preparado a partir de hemácias de camundongos não-infectados. A especificidade do teste HAb foi bem próxima à do teste de imunofluorescência-IgG com *P. falciparum*. Em relação ao teste de referência, os testes HAb e HA_g apresentaram índice de co-negatividade de 0,969 e 0,965, respectivamente.

No grupo de 200 soros de indivíduos de área endêmica, os títulos verificados pelo teste HAb foram significativamente mais elevados que os observados pelo teste HA_g. Obteve-se, ainda, elevado grau de correlação linear entre os títulos de ambos os testes ($r = 0,61$; $p < 0,001$). A diferença de positividade encontrada entre os testes de hemaglutinação foi mais acentuada para os soros de área endêmica, como expresso pelo índice de concordância de 0,765, bem menor que o observado em soros de indivíduos parasitados. Neste grupo de soros, colhidos ao acaso, verificou-se comportamento diferente do teste HAb em relação ao observado em pacientes com parasi-

temia, pois a positividade dos testes HAb e HA_g foi bem menor que a obtida pelo teste de imunofluorescência-IgG. Este comportamento pode ser devido ao fato de o teste HAb detectar principalmente anticorpos IgM, os quais estão associados com infecções atuais, recentes⁸, enquanto que os anticorpos IgG, detectados pelos testes de imunofluorescência indireta, indicam tanto infecção atual como pregressa¹⁵. Em relação ao teste de referência, o teste HAb apresentou índice de co-positividade de 0,528 e de co-negatividade de 0,833, com índice de concordância de 0,565.

A negatização dos soros de maláricos com parasitemia após tratamento pelo 2-mercaptoetanol, a par da permanência dos títulos pelo teste de imunofluorescência-IgG, sugere que o teste HAb detecte, predominantemente, anticorpos da classe IgM. Entretanto, são necessários estudos complementares a fim de que se possa afirmar qual é a principal classe de anticorpos envolvidos.

O estudo da reprodutibilidade do teste mostrou haver uma boa concordância de títulos, tanto em testes realizados em triplicata, no mesmo dia, com o mesmo reagente, como em testes executados com vários lotes de reagentes no mesmo dia ou em dias diferentes.

O fundamento do teste de hemaglutinação com *P. gallinaceum* está na sensibilização *in vivo* das hemácias de aves pelos antígenos exoplasmodiais⁸. Tais antígenos foram descritos no soro de aves com infecção aguda pelo *P. gallinaceum*²⁴ e reagem cruzadamente com anticorpos desenvolvidos na malária humana²⁷. Antígenos solúveis foram detectados no soro de camundongos com infecção aguda pelo *P. berghei*, após 4 dias²³ e 10 dias de inoculação³. Esses antígenos parecem ser liberados, predominantemente, durante a ruptura dos esquizontes maduros¹⁹. Empregando o teste de imunofluorescência indireta com antígeno de *P. berghei*, para pesquisa de anticorpos na malária humana, observou-se que a técnica de extensão de sangue total forneceu resultados satisfatórios, enquanto que, empregando-se apenas os parasitos liberados das células lisadas, os resultados foram inconstantes, variando de lote para lote²². Assim, em alguns lotes, os parasitos apresentaram fluorescência, enquanto que, na maioria deles, observou-se uma fluorescência difusa, não-característica, em todo o campo. Os antígenos solúveis são relevantes na reatividade ao *P. berghei*, embora os antígenos pertencentes ou ligados ao corpo do plasmodio também devam apresentar importância.

Estudos realizados por Poels e cols²¹ em hemácias de camundongos infectados pelo *P. berghei*, empregando soro homólogo hiperimune, demonstraram que apenas parasitos livres e reticulócitos contendo mais de um parasito maduro reagem com os anticorpos; as hemácias maduras não reagem. Os reticulócitos expunham antígenos plasmodiais na superfície da membrana ou dentro do citoplasma, sendo que aproximadamente 10% a 20% dessas células infectadas possuíam antígenos plasmodiais incorporados às suas membranas. Brown e cols.⁶ verificaram que no soro de ratos imunes ao *P. berghei* havia anticorpos específicos para isoantígenos e para antígenos do parasito, ambos presentes na membrana dos reticulócitos infectados. Embora esses estudos tenham sido realizados empregando-se soros homólogos, pode-se supor que tais antígenos plasmodiais, expostos na membrana das hemácias parasitadas por formas maduras, sejam também responsáveis, pelo menos em parte, pelas reações cruzadas que se observam no teste de hemaglutinação com hemácias de camundongos infectados pelo *P. berghei*.

Em conclusão, o teste HAb, ora padronizado, pela alta sensibilidade em casos de malária humana atual, poderá ter aplicação para a detecção de pacientes portadores de parasitemia. Tal diagnóstico se faz necessário tanto para fins clínicos, como para triagem de doadores de sangue, de migrantes que venham para regiões em que a malária está na fase de vigilância, e para estudos epidemiológicos, especialmente no acompanhamento de programas de controle da malária. Por ser de execução simples e rápida, poderá ser realizado por pessoal de nível técnico, mesmo em áreas de poucos recursos econômicos. Porém, são necessários estudos adicionais, a fim de se conhecer melhor o seu comportamento em áreas endêmicas e em amostras de soros seriadas de um mesmo indivíduo antes e após o tratamento específico.

SUMMARY

A hemagglutination test is described for human malaria serodiagnosis with aldehyde-fixed Plasmodium berghei infected mouse erythrocytes. In patients with a P. falciparum or P. vivax patent parasitemia positive results were seen in 98.9% of the 88 cases tested. Titres ranged from 40 to 640. A 96.0% specificity was found for 476 non-malarial patients. A close reproducibility was observed for the test, even for different reagent batches. The test was positive in 48.5% of 200 residents in malaria endemic areas, taken at random. These subjects showed 88.0%

positivity of the IgG-immunofluorescence test. This lower positivity for the hemagglutination test could result from its reactivity with IgM antibodies. After 2-mercaptoethanol treatment, all sera from patients with patent parasitemia were non-reactive. The hemagglutination test, with reference to the IgG-immunofluorescence test, showed a 0.989 co-positivity for patients with a patent parasitemia and a 0.969 co-negativity for non-malarial patients. For residents in endemic areas a co-positivity of 0.528 and a co-negativity of 0.833 were observed.

Key words: Malaria. *Plasmodium berghei*. Serology. Immunodiagnosis. Hemagglutination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avraham H, Golenser J, Gazit Y, Spira D T, Sulitzeanu D. A highly sensitive solid phase radioimmunoassay for *Plasmodium falciparum* antigens and antibodies. Journal of Immunological Methods 53: 61-68, 1982.
2. Boonpucknaving S, Bhamarapavati N. Cross immunofluorescent reactions between human and rodent malaria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 23: 141-145, 1974.
3. Boonpucknaving S, Wongsawang S, Boonpucknaving V, Bhamarapavati N. Serum-soluble malarial antigens and immune complex nephritis in *Plasmodium berghei berghei* infected mice. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 79: 116-119, 1976.
4. Brito B B J H G. O teste da aglutinação do látex para o serodiagnóstico da malária. Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical 1: 139-143, 1973.
5. Brito B B J H G. Um teste de micro-hemaglutinação indireta para o estudo da imunidade na malária. Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical 1: 145-149, 1973.
6. Brown K N, McLaren D J, Hills L A, Jarra W. The binding of antibodies from *Plasmodium berghei* - infected rats to isoantigenic and parasite-specific antigenic sites on the surfaces of infected reticulocytes. Parasite Immunology 4: 21-31, 1982.
7. Ceneviva A C. Malária Humana: Detecção de anticorpos IgM com *Plasmodium falciparum* de cultura por teste de imunofluorescência. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.
8. Ceneviva A C, Camargo M E. *Plasmodium gallinaceum* - parasitized chicken erythrocytes in a practical hemagglutination test for IgM antibodies in human malaria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 28: 622-626, 1979.
9. Correa F M A, Salata E, Sogayar R, Meira D A, Barraviera B, Pita H J, Sperandio L, Mendes R P, Campos E P, Brasil M A M. Malária no Município de Humaitá, Estado do Amazonas. IV - Aspectos soroepidemiológicos com antígeno de *P. berghei*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 23 (supl. 5): 27-31, 1981.
10. Deutsch H F, Morton J I. Dissociation of human serum macroglobulins. Science 125: 600-601, 1957.
11. Gentillini M, Richard-Lenoble D. Utilisation de l'antigène *Plasmodium berghei* pour le séro-diagnostic du paludisme humain par immunofluorescence indirecte. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 65: 815-822, 1972.
12. Giacometti P L, Suter-Kopp V. Detection of malarial antibodies in man by fluorescent antibody test using *Plasmodium gallinaceum* as antigen. Acta Tropica 30: 269-274, 1973.
13. Hoshino-Shimizu S, Camargo M E, Nagasse T K. A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 20: 208-212, 1978.
14. Kielmann A, Sarasin G, Bernhard A, Weiss N. Further investigations on *Plasmodium gallinaceum* as an antigen in the diagnosis of human malaria. Bulletin of the World Health Organization 43: 617-622, 1970.
15. Lobel H O. Indications for and usefulness of serological techniques in epidemiological investigation and assessment. WHO/MAL 81.967, p. 1-11, 1981.
16. Lopez-Antuñano FJ. Falciparum malaria antigen slides for indirect immuno-fluorescence test made from in vitro cultures. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 68: 257, 1974.
17. Mackey L J. Tests for the detection of malaria parasites. WHO/MAL 81.957, p. 1-9, 1981.
18. Maier W A, Piekarski G. Zur serodiagnostik der malaria. *Plasmodium berghei* und *Plasmodium falciparum* als antigen für den indirekten Immunofluoreszenztest. Immunität und Infektion 7: 75-82, 1979.
19. McColm A A, Trigg P I. Double diffusion analysis of antigens released from *P. knowlesi* in vitro. Zeitschrift für Parasitenkunde 64: 353-357, 1981.

20. Meuwissen J H E Th. Immunodiagnostic techniques applicable to malaria. WHO/MAL 81.951, p. 1-10, 1981.
21. Poels L G, Niekerk C C V, Franken M A M. Plasmodial antigens exposed on the surface of infected reticulocytes: their role in induction of protective immunity in mice. *Israel Journal of Medical Sciences* 14: 575-581, 1978.
22. Sanchez-Ruiz M C A, Ceneviva A C, Camargo M E, Ferreira A W, Boulos M, Yasuda M T. Modificação técnica para maior sensibilidade e reprodutibilidade do teste de imunofluorescência com *Plasmodium berghei* ou *P. gallinaceum*, para malária humana. In: Resumos do XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. D27, 1982.
23. Seitz H M. Demonstration of malarial antigens in the sera of *Plasmodium berghei* infected mice. *Journal of Parasitology* 58: 179-180, 1972.
24. Smith A R, Karr L J, Lykins J D, Ristic M. Serum soluble antigens of malaria: a review. *Experimental Parasitology* 31: 120-125, 1972.
25. Snedecor G W. *Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology*, 5th edition, Iowa State College Press, Iowa, 1957.
26. Sulzer A J, Wilson M Hall E C. Indirect fluorescent-antibody tests for parasitic diseases. V. An evaluation of a thick-smear antigen in the IFA test for malaria antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18: 199-205, 1969.
27. Todorovic R, Ristic M, Ferris D H. A tube latex agglutination test for the diagnosis of malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 58-68, 1968.
28. White C. Statistical methods in serum surveys. In: Paul J R, White C. *Serological epidemiology*. Academic Press, London, p. 19-33, 1973.