

MALÁRIA QUIESCENTE APLICAÇÃO DO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA EM DOIS CASOS (*)

Paulo F. Almeida Lopes **, Carlos Eduardo Tosta ***, Nelson G. Pereira ***,
J. Rodrigues da Silva †

Após breve revisão de literatura, os autores apresentam o estudo de dois casos de malária quiescente produzidos por P. falciparum, as curvas térmicas, a de parasitemia e a de anticorpos fluorescentes. Dois pacientes semi-imunes mostraram títulos altos mesmo antes da inoculação e assim persistindo por tempo dilatado, o que também ocorreu com a parasitemia.

INTRODUÇÃO

O termo malária quiescente, embora não esteja definido nem adotado pelo "Terminology of Malaria and Malaria Eradication, WHO 1963), já foi usado na literatura médica. Shute (14) e Walters (19) empregaram-no ao descrever casos de infecção assintomática por *Plasmodium falciparum* respectivamente, 6 a 15 meses após emigração de área endêmica, sendo que um deles, naquela série, foi capaz de induzir infecção por transfusão sanguínea. Outros autores como Mahmood (12) e Robinson, em 1966 (13) referem-se ao mesmo fato, chamando-o de período latente prolongado. Verdrager (16) cita dois casos de infecção por *P. falciparum* com evolução longa sugerindo que, em Mauritius, a infecção possa ultrapassar 3 anos. Black (2) relata um caso em que se desenvolveu malária por *P. falciparum* após transfusão sanguínea de doador com infecção assintomática de longa duração.

Aproveitando tais citações, estendemos o termo para significar evolução prolon-

gada de infecção de *P. falciparum*, induzida em neurosifilítico, com ou sem manifestações clínicas de fase aguda. Tal atitude parece-nos correta já que, até o momento, não se admite que o *P. falciparum* apresente ciclo tetrínico secundário. Assim sendo, aquelas infecções naturais seriam mantidas por merozoítos tais como as induzidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Dois neurosifilíticos foram inoculados por via intramuscular com 5 cm³ de sangue heparinizado proveniente de um paciente que vivia em Araguaina e outro em Formosa, no estado de Goiás, sendo que o último provavelmente adquirira a infecção em Goiânia, após transfusão de sangue de um doador não identificado, como foi descrito por Lopes e Rodrigues da Silva (9). A "raça" proveniente de Araguaina foi inoculada no paciente n.º 33 e convencionamos chamá-la F_{Ar2} e a de Formosa recebeu a sigla F_{F01} sendo

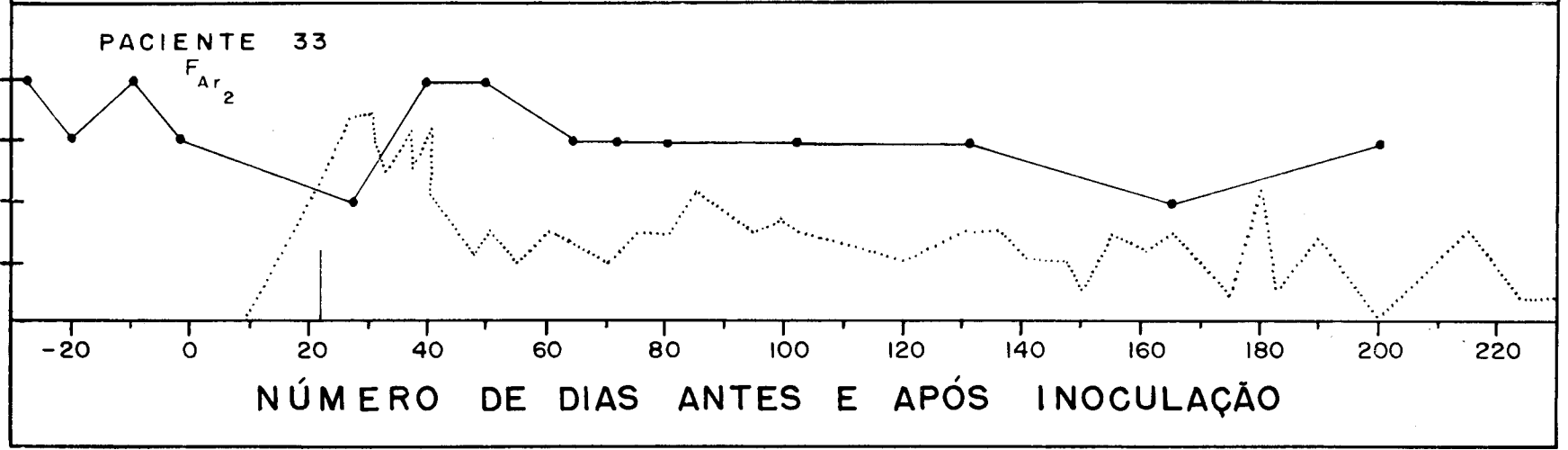
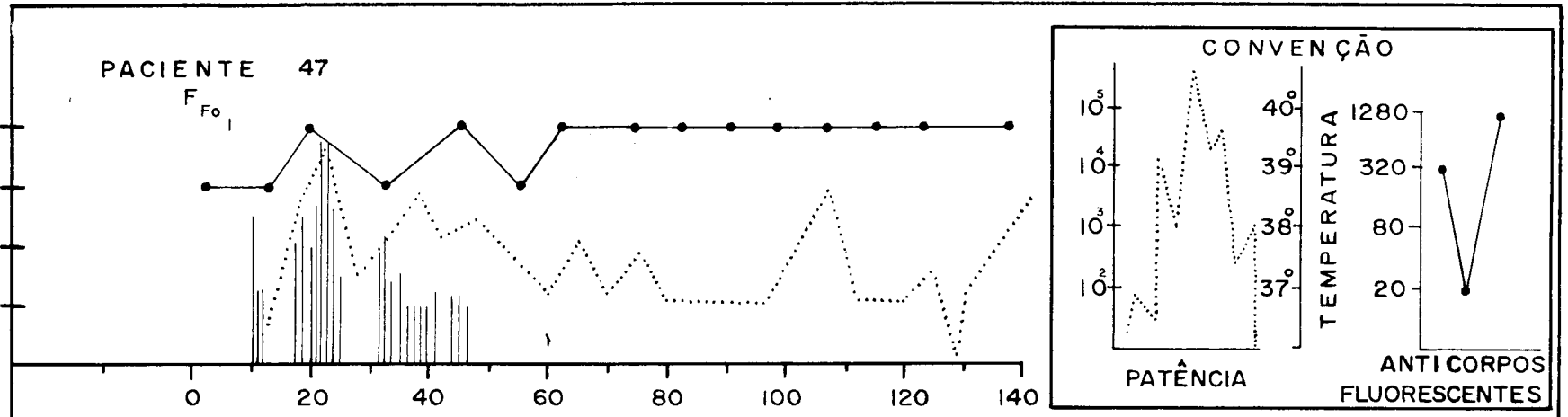
(*) Trabalho realizado no Serviço da Cadeira de Clínicas de Doenças Tropicais e Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob os auspícios do I.N.E.Ru., D.N.E.Ru. e do Grant DA-HC19-67-G-0009 da Armed Force, U.S.A.

Apresentado à II Semana de Debates Científicos da Guanabara promovida pela A.E.M.E., laureado com distinção máxima.

(**) Prof. Assistente.

(***) Auxiliar de pesquisa.

† Professor catedrático, *In memoriam*.



inoculada no paciente n.º 47. Ambos desenvolveram infecção.

O paciente n.º 33, prêto, masculino, 36 anos, natural de Belo Horizonte, Minas Gerais, foi inoculado, pela primeira vez, com sangue proveniente de Araguaina, 30 dias antes da atual infecção mas não desenvolveu sintomatologia nem parasitemia. Com a segunda tentativa, começou a apresentar parasitemia 14 dias após a inoculação, com uma média de 12.000 trofozoitos por milímetro cúbico no fim do primeiro mês, caindo para 2.400, 520, 450, 270 e 400 trofozoitos/mm³ nos meses subsequentes. Gametócitos apareceram no 45.º dia de inoculação. Com 250 dias de infecção, os parasitos circulantes tornaram-se raros e pesquisas sistemáticas em gôta espessa não mais os evidenciaram 2 meses após. Embora se mantivesse infectante evoluiu assintomaticamente nos 10 meses de infecção.

O paciente n.º 47, prêto, masculino, 33 anos, natural de Minas Gerais, após uma fase aguda de 13 dias, apresentou outros picos febris irregulares, por mais 23 dias, tornando-se em seguida, assintomático sem o emprêgo de terapêutica. Iniciou parasitemia 12 dias após a inoculação atingindo um máximo de 28.875 trofozoitos por mm³ e com gametócitos variando sempre em tórno de 1 a 3 por 100 leucócitos. Cinco meses após a inoculação passou à subpatência e à cura espontânea.

Durante todo período de observação, mesmo quando o *plasmodium* estava em subpatência, o sangue dos dois pacientes induzia malária, com evolução clássica, em outros neurosifilíticos receptores.

Os pacientes foram controlados com pesquisa de plasmódios de 6 em 6 horas durante a fase aguda e, pelo menos, duas contagens diárias nos 30 dias seguintes passando então para pesquisas semanais. Cada sete dias retirava-se sangue para hemograma, provas de função hepática e pesquisa de anticorpos fluorescentes.

Na avaliação dos níveis de anticorpos maláricos utilizou-se o método de imunofluorescência indireta, segundo técnica preconizada por Voller (17), ligeiramente modificada. Foram utilizadas lâminas com distensões finas de sangue contendo, em média, 50.000 trofozoitos de *P. falciparum*

por mm³, mantidas a -20°C dentro de desidecador, sem prévia fixação e aproveitadas durante um prazo máximo de 10 dias. Os soros dos dois pacientes foram estocados a -20°C e diluídos, no momento da utilização, a 1: 20, 1: 80, 1: 320 e 1: 1280 com solução salina tamponada. A anti-gama-globulina humana conjugada com isotiocianato de fluoresceína foi obtida comercialmente (*) e para microscopia de fluorescência empregou-se um microscópio Leitz Ortholux com lâmpada Philips CS 150W e filtro excitante BG 12 e bloqueador UV Leitz. De acordo com a intensidade, convencionaram-se três graus de fluorescência (1 + a 3 +). Considerou-se como resultado de cada reação a máxima diluição em que os plmasódios são evidenciados com fluorescência específica.

RESULTADOS

As curvas térmicas, de parasitemia e de anticorpos fluorescentes dos dois pacientes estão representadas na figura 1.

Em ambos os pacientes o nível de anticorpos estava elevado mesmo antes da inoculação infectante. Apresentavam ligeiras variações iniciais, mantendo-se em níveis significativos durante todo o decurso da observação, sendo que, no paciente 47 a curva foi mais elevada que no 33. Apesar de parecer que no início a elevação do nível de anticorpos dependesse do aumento da parasitemia, com o decorrer do tempo esta correlação não parece se confirmar.

DISCUSSÃO

Embora o método de imunofluorescência tenha sido aplicado, pela primeira vez, em malária humana por Tobie e Coatney, em 1961 (15) e posteriormente por Voller e Bray (18), o padrão da curva de anticorpos foi pela primeira vez estudado por Kuvín & Col. (7, 8) e confirmado por Collins & Col. (3, 4), Abele & Col. (1), Coudert & Col. (6), Lunn & Col. (10), Lupascu & Col. (11) e por observações pessoais. Assim, sabemos que o título de anticorpos fluorescentes começa a elevar-se rapidamente entre o 3.º e o 9.º dia do início da parasitemia mantendo-se elevado por tempo bastante dilatado, mesmo na ausência

(*) Fluorescein — conjugated goat antiserum globulin VS Human serum globulin — Microbiological Associate Inc.

de parasitos sanguíneos, caindo muito vagorosamente, em prazo variável.

Os dois pacientes aqui relatados, embora infectados com *P. falciparum* de proveniência geográfica diversa (F_{Ar2} e F_{F01}), apresentaram variações de níveis de anticorpos comparáveis. Ambos, antes da inoculação infectante, já apresentavam títulos altos de anticorpos, diferindo, neste aspecto, dos pacientes primo-infectados.

Pelo que se conhece de história patológica pregressa dos dois pacientes, não se pode afirmar que tenham tido malária, embora, anteriormente, vivessem em área endêmica.

O paciente n.º 33, na 2.ª tentativa de infecção, embora desenvolvesse parasitemia máxima da ordem de 35836 trofozoitos/mm³ apresentou apenas uma elevação térmica de 37°C e tolerou durante 220 dias a infecção sem alterações clínicas ou laboratoriais significativas. É possível que a carga infectante da 1.ª amostra fôsse nula ou baixa demais para causar infecção aparente. Nesta última hipótese ela seria a responsável pela elevação dos níveis de anticorpos fluorescentes verificada antes da 2.ª inoculação. A carga infectante da 1.ª amostra era desconhecida e a da segunda foi de 6166 trofozoitos/mm³.

O paciente 47 recebeu uma carga infectante de 380.000 trofozoitos. Após 11 dias de subpatência apresentou alterações clínicas de fase aguda, acompanhadas por re-

percussões laboratoriais que tenderam à normalização sem terapêutica específica. Os parasitos permaneceram patentes durante 157 dias. Embora não houvesse recebido experimentalmente qualquer carga infectante anterior, o nível de anticorpos fluorescentes já se mostrava elevado no dia da inoculação, permanecendo em níveis bastante significativos durante todo o período em que foi observado.

O fato de estarem os pacientes tolerando uma infecção por plasmódios capazes de produzir reações graves em outros receptores, aliado a suas origens e raças, nos permite considerá-los parcialmente imunes. Não pretendemos com isto garantir que a natureza dos anticorpos fluorescentes seja a mesma dos anticorpos protetores. Podemos apenas registrar que nos dois pacientes aqui relatados a curva daqueles elementos difere do padrão da de pacientes não imunes, o que encontra paralelo em estudos feitos por Collins & Col. (5) em pacientes semi-imunes.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos ao Dr. Amim Curi, Diretor do Hospital Pinel, ao Prof. José Alves Garcia e Dr. Deusdedit de Araújo, responsáveis pelos pacientes neurosifilíticos submetidos a estudo.

S U M M A R Y

The authors, after a brief review of the literature, present two cases of neurosyphilitic in-patients who had blood induced malaria with two different strains of P. falciparum from endemic areas of Goiás.

The fluorescent antibody levels always showed high levels even before the innoculation and remained so during the patency of the infection.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ABELE, D.C.; TOBIE, J. E.; HILL, G.J.; CONTACOS, P.G. e EVANS, C.B. — Alterations in serum proteins and 19S antibody production during the course of induced malarial infections in man. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 14 (2): 191-197, 1965.
- 2 — BLACK, R.H. — Investigation of blood donors in accidental transfusion malaria. — *Plasmodium vivax, falciparum* and malarial infections. *Med. J. Australia*, 2 (12): 446-9, 1960.
- 3 — COLLINS, W. E.; JEFFERY, G.M. & SKINNER, J.C. — Fluorescent antibody studies in human malaria. I. Development of antibodies to *Plasmodium malariae*. — *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 13 (1): 1-5, 1964.

- 4 — COLLINS, W.E.; JEFFERY, G.M. & SKINNER, J.C. — Fluorescent antibody studies in human malaria. II. Development and persistence of antibodies to *Plasmodium falciparum*. Am. J. Trop. Med. & Hyg., 13 (2): 256-260, 1964.
- 5 — COLLINS, W.E.; JEFFERY, G.M. & SKINNER, J.C. — Fluorescent antibody studies in human malaria. III. Development of antibodies to *Plasmodium falciparum* in semi-immune patients. Am. J. Trop. Med. & Hyg., 13 (6): 772-782, 1964.
- 6 — COUDERT, J.; GARIN, J.P.; AMBROISE-THOMAS, P.; SALIOU, P. & LU-HUYNH-THANH — L'immunofluorescente dans le séro-diagnostic des paludismes humains expérimentaux et spontané. Bull. Soc. Path. Exot., 58 (2): 188-207, 1965.
- 7 — KUVIN, S.F. TOBIE, J. E.; EVANS, G.B.; COATNEY, G.R. & CONTACOS, P.G. — Antibody production in human malaria as determined by the fluorescent antibody technique. — Science, 135: (1): 130-131, 1962.
- 8 — KUVIN, S.F. TOBIE, J. E.; EVANS, G.B.; COATNEY, G.R. & CONTACOS, P.G. — Fluorescent antibody studies on the course of antibody production and serum gamma globulin levels in normal volunteers infected with human and simian malaria. Am. J. Trop. Med. & Hyg., 11 (4): 429-436, 1962.
- 9 — LOPES, P.F.A. & RODRIGUES DA SILVA, J. — Infecções post-transfusionais por *Plasmodium falciparum*. Trabalho apresentado no II Congresso da Sociedade Brasileira de Higiene, Curitiba, 1966.
- 10 — LUNN, J.S.; CHIN, W.; CONTACOS, P.G. & COATNEY, G.R. — Changes in antibody titers and serum protein fractions during the course of prolonged infections with *vivax* or with *falciparum* malaria. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 15 (1): 3-10, 1966.
- 11 — LUPASCU, G.; BONA, C.; CIPLEA, A.G.; IANCU, L.; IUANID, L.; BALIFF, E.N. & CONTANTINESCU, P. — The fluorescent antibody technique in the estimation of immunity in patients with *Plasmodium malariae*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 60 (2) 208-21, 1966.
- 12 — MAHMOOD, A. — Prolonged latent period with *Plasmodium falciparum* infections (Correspondence) Brit. Med. J. Feb. 26, 544-5, 1966.
- 13 — ROBINSON, G.L. — Prolonged latent period with *Plasmodium falciparum* infections (Correspondence) Brit. Med. J. Apr. 16, 982, 1966.
- 14 — SHUTE, P.G. — Quiescent malaria parasites (Correspondence). Brit. Med. J., Mar. 5, 730-731, 1960.
- 15 — TOBIE, J.E. & COATNEY, G.R. — Fluorescent antibody staining of staining of human malaria parasites. Exper. Parasit., 11 (2/2):.... 128-32, 1961.
- 16 — VERDRAGER, J. — Observations on the longevity of *Plasmodium falciparum* with special reference to findings in Mauritius. Bull. World Health Org. 31 (5): 747-51, 1964.
- 17 — VOLLER, A. — Fluorescent antibody methods and their use in malaria research. — Bull. World Health Org. 30 — 343-35, 1964.
- 18 — VOLLER, A., & BRAY, R.S. — The fluorescent antibody technique as a measure of antibody to malaria parasites. — WHO/Mal/353, 1962.
- 19 — WALTERS, J. — Quiescent malarial parasites (Correspondence). Brit. Med. Jr. Apr., 16, 1206-7, 1960.