

Bio-208
UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Bio-208

Relatório do Trabalho de Licenciatura

Título: Inibição do crescimento "in vitro" de isolados
de *Plasmodium falciparum*

Autor: Sónia Maria Enosse

Supervisor: Dr. Ricardo Thompson

Consultor: Dr. Custódio Boage

Maputo, Maio de 1995.

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO DO TRABALHO DE LICENCIATURA

Título: INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO "IN VITRO" DE ISOLADOS DE
Plasmodium falciparum

Autor: **Sónia Maria Enosse**

Supervisor: Dr. Ricardo Thompson.

Consultor: Dr. Custódio Boane.

Maputo, Maio de 1995.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação Moçambicana para Investigação em Saúde, "FUMIS", Instituto Nacional de Saúde.

São devidos agradecimentos a todos os que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Uma referência especial aos meus supervisores: ao Dr. Ricardo Thompson pela paciência, e pelas sugestões e discussões havidas para superar as dificuldades surgidas ao longo do trabalho e ao Dr. Custódio Boane pela co-supervisão e ajuda prestada ao longo do trabalho.

A todos os trabalhadores do Departamento de parasitologia de sangue do Instituto Nacional de Saúde, pelas facilidades concedidas e em particular ao Dr. Martinho Dgedge pelas sugestões e orientações havidas sobre alguns aspectos do estudo.

A Dr. Bithe Høgh pela concepção de um estágio em técnicas laboratórias no Statens Serum Institut, Dinamarca, e pelas orientações em alguns aspectos metodológicos; e a todos os trabalhadores deste Instituto pelo apoio prestado durante o curso.

Ao Dr. Aurélio Gomes, pelas orientações na parte estatística.

Ao dr. Almeida Guissamul pela sugestões fornecidas ao longo do trabalho.

Aos meus familiares e a todos os colegas que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Amostras de soros colhidas em indivíduos adultos residentes nos arredores das cidades de Maputo e de Xai-Xai, foram testadas para a sua capacidade de inibir o crescimento "in vitro" de 4 isolados de *P. falciparum* colhidos na cidade de Maputo. A inibição foi determinada pela observação morfológica e contagem de parasitas em esfregaços de sangue, após 48 horas em culturas "in vitro" em presença de diferentes concentrações dos soros a testar, usando como controle um soro comprovadamente não imune. Os soros foram considerados inibidores se mostrassem um grau de inibição igual ou superior a 30%, à concentração de 12,5%.

No geral, os soros testados inibiram em diferentes graus a multiplicação dos isolados do parasita, o que demonstra a presença de factores imunitários contra *P. falciparum* no soro de indivíduos residentes nestas áreas. O grau de inibição aumentou de acordo com as concentrações dos soros e a acção inibitória dos soros foi maior a partir da concentração de 12%, na qual 56.8% do total dos soros tiveram capacidade de inibição superior a 30%.

Os soros foram sub-divididos de acordo com as suas origens, em soros colhidos de indivíduos residentes em Maputo há mais de 4 anos (58%) (Grupo I) e em soros colhidos em residentes em Maputo há menos de dois anos e em Xai - Xai (42%) (Grupo II). Destes grupos, no geral, os soros do primeiro grupo foram comparativamente mais inibidores que os do segundo grupo, se bem que a diferença não fosse estatisticamente significativa ($p > 0.05$), com excepção de um isolado ($p = 0.03$), o que mostra que aparentemente, os indivíduos residentes na área de colheita dos isolados têm maior protecção contra os isolados que circulam nas suas áreas do que os recém chegados ou os residentes noutras áreas. Neste estudo, todas as amostras de soros apresentaram títulos de anticorpos IgG contra malária, embora não se tenha observado uma correlação significativa entre a presença de altos níveis de anticorpos e a capacidade de inibição pelos soros testados ($p > 0.05$).

Os resultados obtidos neste estudo, mostram que testes similares podem ser usados facilmente para detectar diferenças entre estirpes do parasita que circulam em regiões geográficas distintas ou mesmo dentro de uma mesma região.

INDICE

1. INTRODUÇÃO	Pag. 1
1.1. Levantamento e justificação do problema.	Pag. 2
2. OBJECTIVOS	Pag. 6
2.1 Geral:	Pag. 6
2.2 Específicos:	Pag. 6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	Pag. 7
3.1. Área de estudo	Pag. 7
3.1.1- Inquérito parasitológico	Pag. 9
3.2. População estudada e tamanho da amostra.	Pag. 9
3.3. Colheita de amostras	Pag. 11
3.4. Análises laboratoriais	Pag. 12
3.4.1. Preparação do soro.	Pag. 12
3.4.2. Suspensão de parasitas	Pag. 12
3.4.3. Teste de inibição dos parasitas (cultura "in vitro")	Pag. 12
3.4.4. Determinação do nível de anticorpos	Pag. 14
3.5. Análise estatística	Pag. 14
4. LIMITAÇÕES E ENVIESAMENTOS	Pag. 15
5. RESULTADOS	Pag. 15
5.1. Caracterização epidemiológica da área de estudo.	Pag. 15
5.2. Características das amostras de Soro.	Pag. 19
5.3. Inibição do crescimento dos parasitas pelos soros testados.	Pag. 21
5.4. Relação entre densidades parasitárias, sintomas, título de anticorpos e inibição.	Pag. 25
6. DISCUSSÃO	Pag. 28
7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	Pag. 33
8. BIBLIOGRAFIA.	Pag. 35
9. ANEXOS	Pag. 41
Anexo I: Localização geográfica das áreas de colheita das amostras, na cidade de Maputo.	Pag. 41
Anexo II: Cálculo das densidades parasitárias.	Pag. 42

Anexo III: Teste de detecção de cloroquina e seus derivados na urina (Teste de Saker- Solomon's).	Pag. 43
Anexo IV: Esquema da composição da placa de microtitulação usada nos testes de inibição "in vitro"	Pag. 44
Anexo V: Ficha de inquérito sobre dados pessoais e clínicos dos indivíduos testados	Pag. 45
Anexo VI: Crescimento "in vitro" dos diferentes isolados em presença do soro não imune após 48 horas em cultura	Pag. 46
Anexo VII: Inibição do crescimento dos diferentes isolados pelos soros colhidos em indivíduos residentes em Maputo por período igual ou superior a 4 anos (Grupo I).	Pag. 47
Anexo VIII: Inibição do crescimento dos diferentes isolados pelos soros colhidos em indivíduos residentes em Maputo por período igual ou inferior a 2 anos e em Xai- Xai (Grupo I I).	Pag. 49

1. INTRODUÇÃO.

A malária é uma doença parasitária infecciosa transmitida por mosquitos do género *Anopheles*. É causada por protozoários de dimensões muito reduzidas (7.2 µm), pertencentes ao Filo Protozoa, Sub-filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Ordem Coccididae, Sub-ordem Haemosporididae, Família Plasmodidae, e Género *Plasmodium*. Quatro espécies de plasmódio podem infectar o hospedeiro humano: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium falciparum*.

Das quatro espécies *Plasmodium falciparum* é a mais virulenta, sendo responsável por uma enfermidade que desde há longo tempo é uma das principais causas da mortalidade e morbidade no mundo, principalmente nas zonas tropicais e subtropicais.

Estima-se que mundialmente, mais de 300 milhões de indivíduos estejam infectados e que aproximadamente 300 a 500 milhões de casos clínicos ocorram por ano (W.H.O. 1994). Esta, assume particular importância na África sub-Sahariana, onde é provocada principalmente por *Plasmodium falciparum*. Nesta região, a malária é a principal causa de mortalidade infantil, causando a morte de cerca de um milhão de crianças por ano (W.H.O. 1994).

Em Moçambique, cerca de 50% da população está permanentemente infectada por *Plasmodium falciparum*, sendo a enfermidade por este provocada, a segunda causa da morbidade registada nas unidades sanitárias, depois das doenças respiratórias agudas (Martinenko 1994a). A malária ocorre em todas as províncias de Moçambique, embora com diferentes graus de endemicidade. Nas regiões onde a transmissão é intensa, existe um número considerável de indivíduos adultos com parasitemia assintomática, sendo as manifestações clínicas frequentes principalmente em crianças de 1 a 14 anos de idade (Martinenko 1994a). Este facto revela que a imunidade contra os parasitas causadores da malária se instala lentamente desde o nascimento, resultando num padrão etário de infecção e doença dependentes da intensidade de transmissão.

O tempo de exposição é crucial pois a imunidade protectora contra as infecções causadas pelos parasitas da malária só se estabelece através de uma frequente exposição ao parasita (Day e Marsh 1991, Knell 1991).

A necessidade de um longo período de exposição para a aquisição de imunidade protectora poderá ser explicada pela diversidade antigénica que ocorre entre as diferentes estirpes destes parasitas e mesmo pela variação que pode ocorrer numa mesma estirpe no decurso da mesma infecção. Assim, o sistema imunitário dos indivíduos deverá reconhecer a maior parte das variantes antigénicas na região, para estar preparado para exercer uma eficiente acção protectora durante a infecção malárica provocada por qualquer delas (Terry 1988).

Deste modo, indivíduos adultos residentes em áreas de alta transmissão possuem um considerável grau de imunidade que os protege das infecções subsequentes ou pelo menos das manifestações clínicas da doença (Knell 1991). Nestes indivíduos semi-ímmunes, o sistema imune é capaz de controlar os níveis de parasitémia durante a infecção, mantendo-a quase sempre a baixos níveis, daí que as infecções sejam geralmente assintomáticas. Nestas áreas, os casos clínicos ocorrem principalmente em crianças dos 4 meses a 5 anos de idade, nas quais ainda não se estabeleceu imunidade, ou em indivíduos não ímmunes que venham a residir na região (Knell 1991).

♦ 1.1. Levantamento e justificação do problema.

Alguns microorganismos patogénicos têm a capacidade de durante a infecção alterar rapidamente os seus antígenos quando o sistema imunitário do indivíduo infectado reage com a produção de anticorpos específicos para os antígenos prevalentes no momento da infecção (Brown 1971). Assim, após as fases iniciais da infecção, uma população parasitária antigénicamente distinta torna-se patente (Howard 1992). Este processo, de variação antigénica deve ser um meio importante de evasão das respostas imunitárias (Terry 1988).

Há evidências de que um considerável grau de heterogeneidade antigénica ocorre entre as estirpes de *Plasmodium falciparum* (Chulay *et al.* 1985). Por isso, antes que se desenvolva uma resposta imune parcialmente protectora, o organismo humano tem que entrar em contacto com o vasto repertório de antígenos expressos nas diferentes estirpes do parasita (Terry 1988). Esse repertório antigénico, aparentemente, varia de região para região pelo que o sistema imune humano só poderá guardar memória daqueles que circulam na região onde o indivíduo resida.

Mesmo que contraíam a infecção malarica, adultos semi-ímmunes residentes numa determinada área endémica, tendem a manter-se assintomáticos. Contudo, há fortes evidências de que os mesmos podem desenvolver um quadro de malária clínica quando entram em contacto com outras estirpes de parasitas após a sua transferência para outra região geográfica (Terry 1988).

A resposta imunitária do organismo humano, é em regra de natureza humoral e celular, podendo haver o predomínio de um dos tipos dependendo do agente infeccioso.

A imunitade adquirida em infecções causadas pelos parasitas da malária é específica para as diferentes espécies e para os diferentes estágios do ciclo de desenvolvimento do parasita. De facto o grau de exposição das diferentes fases de desenvolvimento do *Plasmodium* ao sistema imune humano difere consideravelmente, resultando em diferentes intensidades de resposta humoral e celular.

Assim, os esporozoítos inoculados no sangue do hospedeiro humano por fêmeas *Anofelineas* infectadas (Figura 1), têm um curto período de permanência na circulação sanguínea (cerca de 30 minutos), após o que invadem as células hepáticas. Aí, cada esporozoíto vai desenvolver-se e multiplicar por um processo denominado esquizogonia hepática ou exo-eritrocitária, dando origem a aproximadamente 30.000 merozoítos. Quando completamente desenvolvidos os esquizontes hepáticos rompem-se e os merozoítos penetram na circulação sanguínea invadindo individualmente os eritrócitos. Apesar da curta duração da fase esporozoítica no organismo humano, estes induzem uma marcada produção de anticorpos (Tapchaisri et al 1983, Druilhe et al 1986, Esposito et al 1988). Contudo esses anticorpos não parecem ter papel relevante na protecção contra a malária, servindo mais adequadamente como um indicador do grau de exposição do indivíduo ao parasita (Druilhe et al 1986).

Os merozoítos que invadem os eritrócitos entram num ciclo de esquizogonia eritrocitária com duração de cerca de 48 horas da qual resulta a produção de esquizontes com 8-32 merozoítos. À semelhança do que ocorre na esquizogonia hepática os esquizontes eritrocitários quando maduros rompem-se libertando merozoítos que imediatamente vão invadir novos eritrócitos, repetindo-se o ciclo. Os eritrócitos infectados ou não, estão, como se sabe, em circulação pelo organismo humano pelo que o contacto do parasita

com o sistema imune do indivíduo é prolongado. Este facto aliado à marcada capacidade de multiplicação desta fase parasitária faz com que durante este período se verifique a mais potente reacção humoral e celular do sistema imune (Marsh et al 1989). São inumeros os antígenos expressos nesta fase de desenvolvimento sanguíneo do plasmodio e que induzem uma mais ou menos marcada produção de anticorpos. Contudo, está comprovado que muitos desses anticorpos não têm qualquer papel protectivo, sendo também difícil definir quais os que têm alguma eficacia protectiva. Sendo esta a fase do parasita responsável pelos sintomas, factores imunitarios contra estes dirigidos poderão ter alguma contribuição na protecção contra a doença.

Após vários ciclos eritrocitários, alguns trofozoítos possivelmente por estarem sob pressão da defesa imunitária do hospedeiro desenvolvem-se em formas alternativas, os gametócitos, ao invés de entrar em esquizogonia. Os gametócitos também induzem a produção de anticorpos que provavelmente têm alguma acção bloqueadora da transmissão, mas absolutamente nenhuma influência na severidade clínica da infecção.

Como fica evidente, a fase eritrocítica do *Plasmodium* é a responsável pela mais potente e mais efectiva resposta imune contra a infecção e manifestações clinicas da mesma.

Nesta resposta imune tanto a imunidade humoral como a imunidade celular são componentes essenciais (Cohen et al. 1970, Deans e Cohen 1983, Weidanz e Long 1988, Good e Miller 1989).

Pensa-se que a imunidade adquirida é mediada por anticorpos, particularmente os dirigidos aos antígenos do estágio merozoítico. Estes anticorpos podem ser detectados pela sua habilidade em inibir o crescimento de *Plasmodium falciparum* "in vitro" (Cohen et al. 1969).

Daí que a transferência passiva de imunoglobulinas de adultos imunes para crianças infectadas induz uma redução efectiva do nível de parasitémia. Este fenomeno prova a existência de uma componente protectora no soro de individuos imunes: os anticorpos (Cohen et al. 1970). Estes podem actuar destruindo os parasitas ou incrementando o processo de fagocitose, inibindo a invasão de novos eritrócitos pelos parasitas ou retardando o desenvolvimento dos parasitas dentro destes.

Contudo, a acção dos anticorpos é complementada por outros factores serológicos, possivelmente produzidos como parte da imunidade mediada por células, tais como o sistema de complemento, o interferão (uma linfoquina secretada pelas células T que activa a actividade dos macrófagos), e os chamados factores de Crise (Jensen et al. 1983).

Para determinar o efeito de soros imunes ou das imunoglobulinas sobre os parasitas da malária e como forma de entender melhor a imunidade adquirida contra estes, foram realizados varios estudos "in vitro" (Jensen et al. 1982, Brown et al. 1983, Golenser et al. 1983, Stanley e Reese 1984, Waa et al. 1984).

Estes, demonstraram que soros de individuos imunes inibem o crescimento e a multiplicação de *Plasmodium falciparum* "in vitro".

Nas Filipinas (Sy et al. 1990) e em Africa (Wilson e Phillips 1976), verificou-se que diferentes isolados de *Plasmodium falciparum* mostram diferente susceptibilidade "in vitro" a soros de diversas regiões geográficas.

Este facto pressupõe a existência das já citadas diferenças nas respostas imunes dependendo da estirpe do parasita, ou seja um individuo com alta imunidade contra estirpes locais pode ter pouca ou nenhuma protecção contra as estirpes que circulam noutros países ou mesmo em outras regiões no mesmo país.

Vários outros estudos foram realizados nos quais se verificou que soros imunes ou imunoglobulinas inibem a multiplicação e o crescimento de isolados de *Plasmodium falciparum* da mesma região (homólogos) e não inibem os de região diferente ou heterólogos (Jeffrey 1966, Brown et al. 1982, Brown et al. 1983).

No entanto, contraditoriamente, Mcgregor (1963) em estudos "in vivo" e Jepsen (1983) "in vitro", demonstraram que os soros tinham a capacidade de inibir tanto os isolados homologos quanto os heterólogos. Estes resultados evidenciam a existência de alguns casos de imunidade cruzada entre estirpes de *Plasmodium falciparum*.

É, no entanto, de salientar que este tipo de estudos são baseados em provas "in vitro" muito delicadas, que podem ter diferentes graus de eficiência em diferentes ocasiões.

Moçambique, nos anos 1989-1992 esteve sujeito a uma guerra que originou uma evolução em termos de aumento do número de casos, da situação da malária (Martinhenko 1994a). Esta, resultou em grandes movimentações das populações das zonas rurais para as peri-urbanas ou urbanas, que ao construírem habitações provisórias, machambas e usando sistemas de irrigação primitivos, criaram condições favoráveis para transmissão da doença. Outro factor a considerar neste grupo de indivíduos é o enfraquecimento do seu sistema imunitário o que lhes torna mais vulneráveis a doença.

Como consequência destes estudos em que está evidente a existência de diferenças na resposta imune dependendo do isolado do parasita e devido as movimentações das populações, surge uma necessidade de realização de um estudo similar. Com este trabalho, pretende-se fazer um estudo preliminar sobre a imunidade adquirida contra infecções causadas por *P.falciparum* em algumas regiões de Moçambique e verificar se as movimentações tiveram algum impacto na especificidade da imunidade nesta doença.

2. OBJECTIVOS.

♦ 2.1 Geral:

Avaliar a capacidade de soros imunes, de diferentes regiões geográficas de Moçambique, de inibir o crescimento de *Plasmodium falciparum* "in vitro".

♦ 2.2 Específicos:

2.2.1. Determinar o grau de crescimento "in vitro" de isolados de uma dada região geográfica, nas seguintes circunstâncias:

- Em presença de soros de indivíduos da mesma região geográfica;
- Em presença de soros de indivíduos de outra região geográfica.

2.2.2. Determinar a relação entre o título de anticorpos IgG totais contra malária nas amostras de soro e a capacidade inibitória destes.

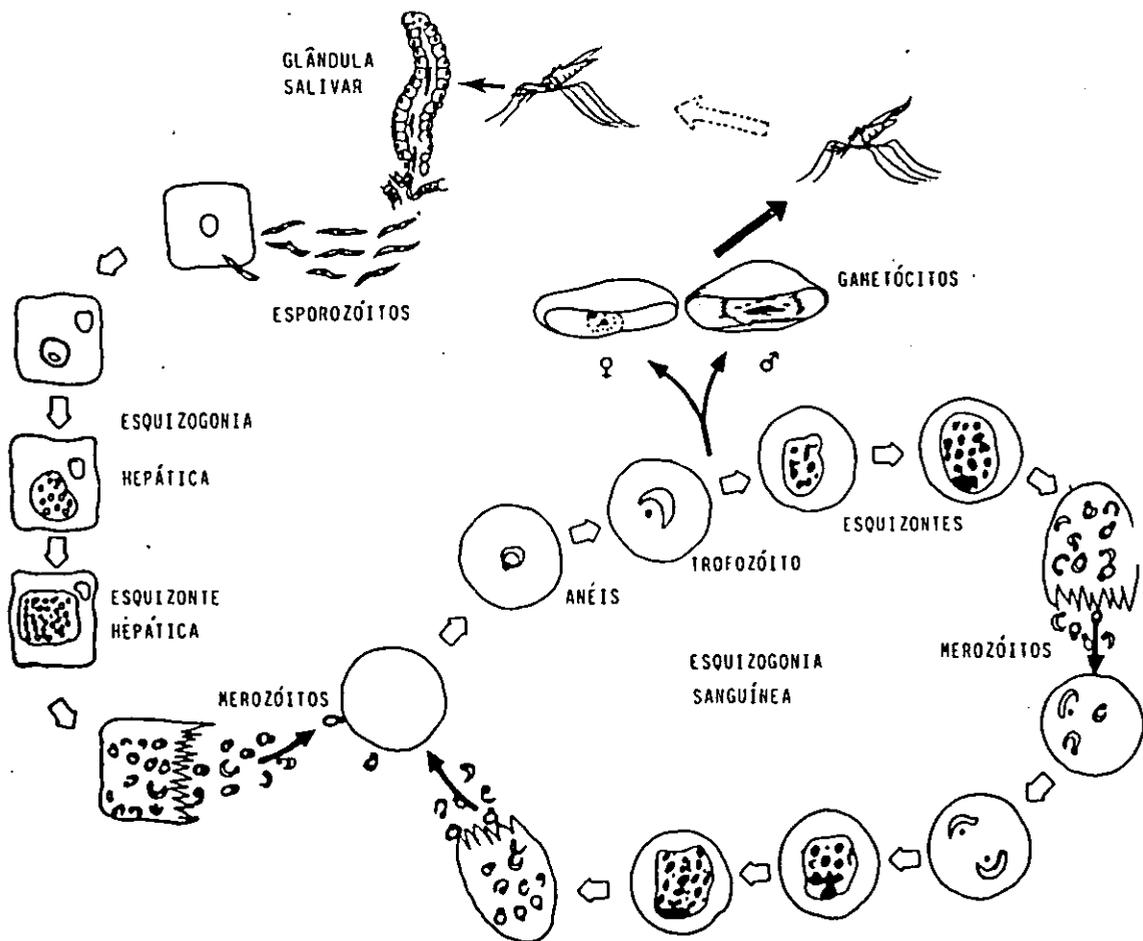


Figura 1: Ciclo de vida dos parasitas da malária.

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

• 3.1. Área de estudo

O estudo foi realizado em áreas suburbanas de duas províncias do sul do país: província de Maputo e de Gaza.

Na província de Maputo, foram abrangidos os bairros: Matola "A" quarteirão (Q.) 40, 41 e 42; Polana Caniço "B", Q.53 e 54; Urbanização Q.23 e 24, e na província de Gaza, o Bairro 2 da cidade de Xai-Xai, quarteirões "A, B e C" (vêr anexo I).

O clima destas regiões é tropical húmido, com estação chuvosa de Novembro a Abril e seca de Julho a Outubro. A precipitação média anual encontra-se entre 500 - 900 mm e o total anual oscila entre 600-1200 mm, sendo 75% entre Novembro e Abril. A temperatura média mensal situa-se entre 23-26°C, na estação chuvosa (dados do Instituto Nacional de Meteorologia).

O tipo de habitação predominante é de construção precária (feito por material tradicional, caniço e capim), o que torna fácil o acesso dos mosquitos.

A população é basicamente camponesa.

A actividade das populações residentes nos bairros Matola "A", Urbanização e Bairro 2 da cidade de Xai-xai é a agricultura e das residentes no bairro Polana caniço "B" é a pesca artesanal embora pratiquem também a agricultura com machambas e hortas nas zonas residênciais, apesar da alta densidade populacional.

A transmissão da malária nestas áreas é sazonal, ocorrendo intensamente na estação chuvosa, de Novembro a Abril, altura em que ocorrem o maior número de casos clínicos comparativamente a estação seca na qual também se registam casos de infecção malárica. As densidades parasitárias mais altas registam-se no final da estação chuvosa, sendo mais de 90% das infeções causadas por *Plasmodium falciparum* (Noticiário Epidemiológico 1992).

A localização destas áreas em zonas pantanosas, com presença de rios (Rio Matola e Limpopo), água estagnada, valas de drenagem (Bairro da Urbanização) e outros tipos de viveiros para os mosquitos, causados pela intensa precipitação, favorecem o crescimento e a multiplicação dos mosquitos nestas regiões; factor que contribui para o elevado número de indivíduos infectados.

A área de estudo na província de Maputo, sofreu uma infiltração permanente de novos habitantes, nos anos 1990-1992, provenientes de outras regiões, fundamentalmente do sul do país, onde a malária também é endêmica.

♦ **3.1.1. Inquérito parasitológico**

Para a caracterização epidemiológica da área de estudo, foram realizados inquéritos parasitológicos em 75 indivíduos por quarteirão.

O inquérito foi realizado entre os meses de Novembro de 1993 a Janeiro de 1994, antes e independentemente da colheita de sangue para obtenção dos soros.

As colheitas foram efectuadas por busca de casa a casa e os inquiridos foram de ambos os sexos e pertencentes aos diferentes grupos etários.

Após a colheita, da gota espessa e esfregaço, as lâminas foram transportadas para o laboratório do Departamento de Parasitologia de Sangue do Instituto Nacional de Saúde, onde foram coradas pelo Giemsa e examinadas ao microscópio com um aumento de 800x. Em cada lâmina contou-se o número de parasitas assexuais presentes em 500 leucócitos.

O exame das lâminas foi feito duas vezes, por dois indivíduos independentes, a autora do trabalho e um microscopista do laboratório, para assegurar que os resultados fossem os mais correctos. O resultado usado foi a média dos dois exames.

Feita a contagem calculou-se a densidade parasitária em cada indivíduo, assumindo um valor médio de 8000 glóbulos brancos por microlitro de sangue (anexo II).

Foram determinados os índices parasitários (I. P.) (parasitas assexuados), os índices gametocitários (I.P.) (parasitas sexuados), as densidades parasitárias, e foram determinadas as diferentes espécies de plasmódio existentes em cada região.

♦ **3.2. População estudada e tamanho da amostra.**

As amostras de soro foram colhidas de indivíduos de ambos os sexos com infecção simples de *P. falciparum*, sintomáticos ou assintomáticos, com idades superiores a 15 anos, seleccionados dos indivíduos incluídos no inquérito parasitológico.

Foram excluídos do teste todos os indivíduos que tivessem tomado cloroquina na altura ou duas semanas antes da colheita das amostras, o que foi confirmado pela realização

de um teste de detecção de cloroquina e seus metabolitos na urina, uma adaptação do teste de Saker-Solomons (Mount *et al.* 1989).

O teste foi realizado no campo, na altura da colheita (anexo III). Foram também excluídos indivíduos que tivessem tomado outros anti-maláricos o que foi confirmado por depoimento dos indivíduos em estudo e dado que cloroquina é o único anti-malárico com venda livre e ao qual as populações têm maior acesso, pressupõe-se que de facto não existiam outros anti-maláricos nos indivíduos seleccionados.

O tamanho total da amostra foi recolhido em 100 indivíduos, distribuídos em dois grupos: o Grupo I composto por 58.0% de indivíduos a residirem na província de Maputo num período igual ou superior a 4 anos; e o segundo de 42.0% de indivíduos residentes na província de Maputo por período igual ou inferior a 2 anos e residentes na província de Gaza (Xai-Xai). Os indivíduos a residir na província de Maputo por período igual ou inferior a dois anos foram considerados, em conjunto com os residentes na província de Gaza, como do Grupo II dado o facto destes possivelmente não terem adquirido uma imunidade protectora contra os isolados que circulam na província de Maputo, contra os quais nunca tinham entrado em contacto. Isto, porque se sabe que a protecção contra infecções causadas por *Plasmodium falciparum* resulta de efeitos cumulativos de repetidas exposições ao parasita (Day e Marsh 1991, Deloron e Chougnat 1992).

A distribuição das amostras por bairro de colheita é ilustrada na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Amostras de soro colhidas por bairro de origem e tempo de residência.

Local de colheita	Grupo I	Grupo II	Total por Área
Matola A	15	2	17
Polana Caniço B	29	8	37
Urbanização	14	8	22
Xai-Xai	0	24	24
TOTAL	58	42	100

Grupo I = residentes na Província de Maputo há mais de 4 anos.

Grupo II = residentes na Província de Maputo há menos de 2 anos e residentes na Cidade de Xai-Xai.

O tamanho da amostra de indivíduos a serem estudados foi calculado com ajuda do programa estatístico Epiinfo 5.0; tendo como base os dados dos índices parasitológicos ou prevalência da doença (60-70%) encontrados naquelas regiões em estudos anteriores efectuados pelo Instituto Nacional de Saúde (dados não publicados), e seleccionado segundo o método de amostragem probabilística do tamanho.

Para o cálculo do mesmo foram também considerados os dados do tamanho da população nas áreas de estudo (aproximadamente 40 000 habitantes), a sensibilidade do teste (80%), a eficiência do teste (75%) e poder de estudo de 90%.

♦ 3.3. Colheita de amostras

De cada indivíduo incluído no estudo foi registado o nome, a idade, o sexo, a presença ou ausência de sintomas, durante a colheita e uma semana antes da mesma, segundo o inquérito em anexo V. Deste inquérito foi também possível identificar os indivíduos recém-chegados e as suas respectivas regiões de origem.

A estes indivíduos foram colhidas amostras de sangue para obtenção dos soros de Novembro de 1993 a Janeiro de 1994.

Para obtenção dos soros, foram recolhidos 2 ml de sangue de cada indivíduo, por punção capilar em tubos com heparina

Durante a colheita foram simultaneamente preparados esfregaços e gota espessa, por colheita de sangue capilar, directamente para a lâmina, em cada indivíduo. Estas foram posteriormente coradas pelo Giemsa e examinadas ao microscópio para contagem e cálculo da densidade parasitária de cada indivíduo na altura da colheita de sangue. A contagem foi feita de acordo com o descrito no anexo II.

Para a recolha do sangue foram utilizadas seringas e agulhas estéreis descartáveis.

• **3.4 Análises laboratoriais**

• **3.4.1. Preparação do soro.**

Após a colheita, o sangue foi centrifugado e posteriormente separado o soro. Este foi armazenado em tubos Eppendorf de 1,5ml, a -20°C até altura do uso.

Antes do teste, os soros foram inactivados durante 30 min a 56°C, em "Banho Maria" e foram posteriormente esterilizados por filtração com filtros Millipore de 0,45 µm.

• **3.4.2. Suspensão de parasitas**

Foram usados 4 isolados de *Plasmodium falciparum* provenientes de indivíduos residentes no bairro Matola "A", num período superior a quatro anos (333, 7112, 666 e 7113).

Depois da colheita, o sangue destes indivíduos foi centrifugado, retirou-se o sobrenadante e lavou-se a camada de eritrócitos duas vezes usando meio de cultura incompleto (sem soro). Após a lavagem diluiu-se o sangue em meio completo para obtenção de um hematócrito de 12,5% que seria posteriormente diluído na placa do teste.

• **3.4.3 Teste de inibição dos parasitas (cultura "in vitro")**

O teste foi realizado segundo metodologia adaptada a partir de Jensen, *et al* (1982).

Foi usado para cultura o meio RPMI 1640, contendo 5% de NaHCO₃ e 10% de soro humano A⁺ não imune (meio completo).

Os parasitas, no início do teste, encontravam-se no estágio de anéis e ou trofozoitos. As parasitémias iniciais variaram de 0,6 a 1% e o hematócrito de 4-5%.

As amostras de soro foram diluídas em meio completo para obtenção das concentrações finais de 50, 25, 12, 6 e 3%; e testadas para inibição do crescimento dos diferentes isolados do parasita, em duas filas de placas de microtitulação (vêr anexo IV).

A cada cavidade da placa, contendo 100 µl das diferentes concentrações dos soros, foram adicionados 50 µl da suspensão de parasitas preparada como o indicado acima.

As placas foram incubadas durante 48 horas a 37°C, numa atmosfera húmida de aproximadamente 5% CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂, obtida pela combustão de velas, para permitir a maturação de esquizontes e que estes libertassem novos merozoítos estabelecendo-se uma nova geração de parasitas com a invasão de novos eritrócitos.

Depois de 48 horas, usando a camada de eritrócitos de cada cavidade foram preparados esfregaços para visualização morfológica e contagem dos parasitas. Contou-se o número de parasitas assexuais presentes em 2000 eritrócitos.

A contagem foi repetida para cada teste (feita por dois indivíduos independentemente) e calculou-se a média do crescimento ou maturação dos parasitas.

Em simultâneo com os soros imunes, foi testada uma amostra de soro não imune, testado previamente para o título de anticorpos contra malária pelo teste de IFAT com resultado negativo (título de anticorpos menor que 1:20). Este serviu de controle.

O cálculo das percentagens de inibição realizou-se segundo a fórmula:

$$PI = 100 - (PT \times 100 / PC)$$

Onde:

PI = Percentagem de inibição do crescimento.

PT = Percentagem de maturação dos parasitas no teste (em presença de soro imune).

PC = Percentagem de maturação dos parasitas no controle (em presença de soro não imune).

Foram também preparadas em simultâneo com as placas do teste, placas contendo apenas suspensão de parasitas e meio completo, para controlar o crescimento das culturas.

A partir destas placas, após 24 horas de incubação foram preparadas lâminas (gota espessa) para verificar se houve maturação de esquizontes, factor que permite controlar o bom crescimento da cultura e determinar o fim do teste.

O teste foi considerado positivo, se depois das 24 horas de incubação da placa control se tivesse verificado maturação para o estágio de esquizontes numa proporção de 20 ou mais esquizontes por 200 parasitas assexuados ou seja percentagem de maturação igual ou superior a 10%.

• **3.4.4. Determinação do nível de anticorpos**

Para conhecer o grau de contacto dos indivíduos com os parasitas, todas as amostras de soros foram testadas para determinar o nível total de anticorpos IgG contra malária pela técnica standard de imunofluorescência, IFAT (Voller 1988).

Para o teste, foram usados como antígenos eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* provenientes de culturas de isolados colhidos em indivíduos residentes na provincia de Maputo, com uma proporção de esquizontes maduros de 3-5%.

Diluições duplas de cada amostra de soro foram incubadas em lâminas previamente preparadas com o antígeno. Em seguida foi adicionado o conjugado IgG marcado com fluoresceína, incubou-se e de seguida procedeu-se à leitura dos resultados num microscópio de fluorescência.

O título de anticorpos de cada amostra de soro foi calculado como o recíproco da concentração mínima de detecção da fluorescência.

♦ **3.5. Análise estatística**

Os resultados referentes ao inquérito parasitológico e individual e aos testes laboratoriais foram computarizados nos programas Dbase e Epiinfo5 e analisados no programa estatístico Epiinfo5.

Para calcular a significancia estatística de diferença entre os parametros analisados (idade, temperatura, valores de inibição, pelos soros das dos dois grupos e entre os diferentes isolados), fez-se primeiro uma análise estatística descritiva dos dados das amostras (calcula da média, desvio padrão, valores mínimos e máximos, variância e teste

χ^2), para analisar a distribuição da amostra, o que permitiria a escolha do teste estatístico mais apropriado.

De seguida, investigou-se se existem diferenças significativas entre os dois grupos de amostras, para cada parametro, utilizando os testes não paramétricos de Wilcoxon para calcular diferenças entre duas médias e de Kruskal - Wallis H para comparar diferenças entre mais de duas médias, quando a distribuição da amostra não fosse normal e a variância não homogênea (Rosner 1986, Wonnacott e Wonnacott, 1990).

Para analisar a relação entre os títulos de anticorpos, as densidades parasitárias, sintomas e a capacidade de inibição pelos soros dos dois grupos foi usado o teste de regressão linear, que permite investigar a associação entre duas variáveis contínuas.

4. LIMITAÇÕES E ENVIESAMENTOS.

O estudo foi realizado usando como parasitas amostras de sangue colhidas de indivíduos infectados nos quais não foi possível obter quantidades de amostra superior a 5 ml. Este factor não permitiu testar todos os soros para cada isolado como seria recomendável.

Com os resultados do presente trabalho não se pode chegar a conclusões sobre que factores serológicos participam directamente na inibição da invasão de novos eritrocitos já que o grau de complexidade da análise desses factores ultrapassa o âmbito deste trabalho.

5. RESULTADOS

♦ 5.1. Caracterização epidemiológica da área de estudo.

Para caracterização epidemiológica das áreas de estudo, foram colhidas amostras de sangue em 728 indivíduos, dos quais 504 da área da província de Maputo e 224 da área da província de Gaza.

A média de idades na amostra estudada foi de 16.9 anos (desvio padrão = 15.2), e estas oscilaram entre 2 meses e 74 anos, havendo uma diferença significativa entre as duas áreas ($\chi^2 = 9.23$ $p = 0.009$).

Dos indivíduos estudados, 64,5 % eram do sexo feminino contra 35,5% do sexo masculino (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das amostras por Idade e Sexo em cada bairro de estudo.

Bairro de Estudo	N	Idade		Sexo	
		Media	Desvio Padrão	F	M
Matola A	230	17.5	16.4	59.6	40.4
Polana Caniço B	150	14.2	12.9	61.3	38.7
Urbanização	124	19	14.9	62.1	37.9
Bairro 2 do Xai-Xai	224	16.9	15.12	68.3	31.7
TOTAL	728	16.9	15.2	64.5	35.5

A prevalência total de infecção malárica foi de 55,8% na área da Província de Maputo e 47,0% na área da cidade de Xai-Xai ($X^2 = 4.9$, $p = 0.02$).

Em qualquer das áreas, *Plasmodium falciparum* foi a espécie mais frequentemente encontrada comparativamente a *Plasmodium malariae* e a *Plasmodium ovale* (Tabela3).

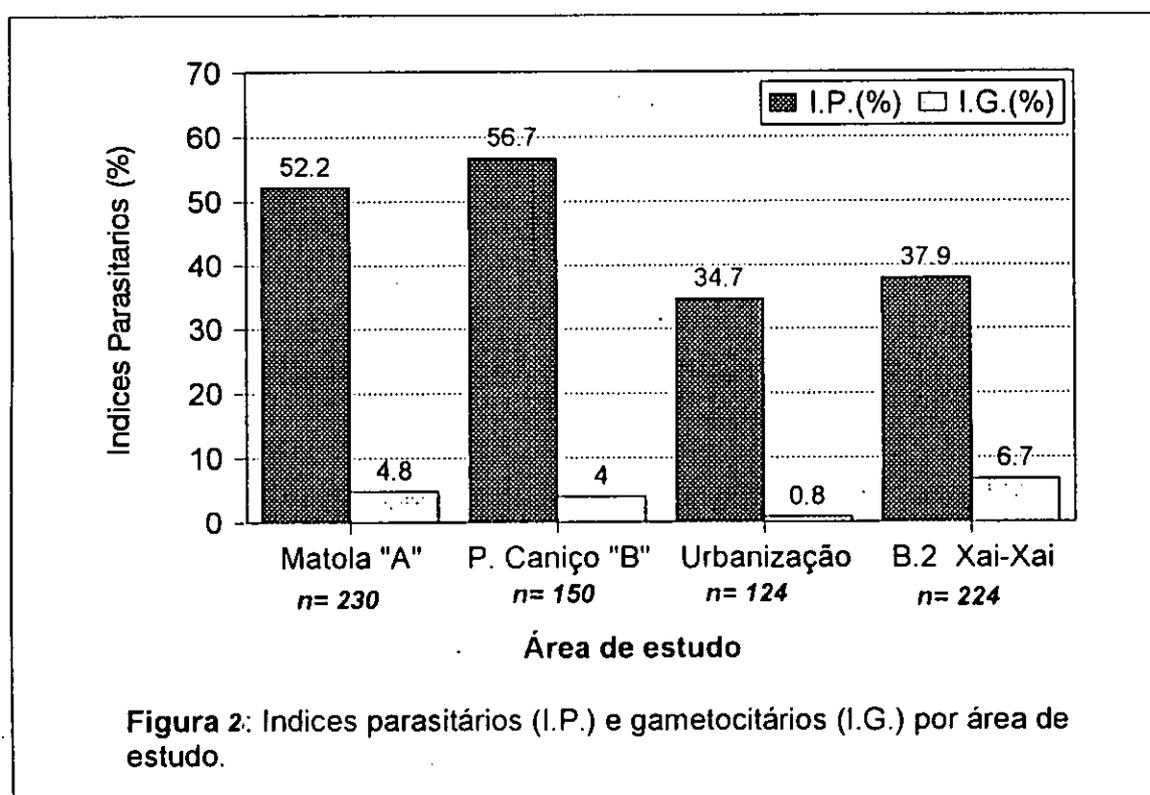
Tabela 3. Prevalência dos plasmodios por espécie e por bairro de estudo.

Espécie	Matola A (n=230)	Polana Caniço B (n=150)	Urbanização (n=124)	Bairro 2 do Xai-Xai (n=224)
<i>P. falciparum</i>	52.2%	56.7%	34.7%	37.9%
<i>P. ovale</i>	0.0%	0.7%	0.0%	0.4%
<i>P. malariae</i>	2.2%	4.0%	2.4%	2.2%

No caso específico da província de Maputo, o Bairro da Polana Caniço "B" registou o maior índice parasitário (I.P.) (56,7%), sendo o menor encontrado no Bairro da Urbanização (34,7%) (Figura 2). Foram observadas ligeiras diferenças nos I. P. nos três bairros da província de Maputo. Contudo esta diferença não é estatisticamente significativa ($X^2 = 2.12$, $p = 0.145$), em oposição ao observado entre a área da província de Maputo e a área da cidade de Xai-Xai ($X^2 = 7.9$, $p = 0.004$).

Verificou-se que independentemente da bairro de estudo, os I.P. foram maiores nos grupos etários dos 2-4 e 5-9 anos, sendo os grupos menos afectados os de menos de 2 anos e o de indivíduos maiores de 15 anos (Figura 3).

A prevalência de portadores de gametócitos, Índice Gametocitario (I.G.) na província de Maputo foi maior na Matola "A" (4.8%) e menor no Bairro da Urbanização (0,8%), enquanto que no Bairro 2 da cidade de Xai-Xai o I.G. foi de 6,7% (Figura 2).



A média geométrica das densidades parasitárias dos indivíduos *Plasmodium falciparum* positivos foi consistentemente mais alta no grupo etário dos 0 aos 23 meses em todos os bairros estudados, havendo em todos os casos uma diferença significativa entre os grupos etários ($p < 0.002$) (Figura 4).

As temperaturas axilares dos indivíduos incluídos no inquérito parasitológico situavam-se entre os 35,0 °C e 40,0 °C, não se observando diferenças significativas entre as médias nas áreas de Maputo (36.4 °C) e de Xai-Xai (36.7 °C) ($X^2 = 3.51$ $p=0.169$).

Foram registados 3,8% e 6,7% casos de febre (definida como temperatura axilar igual ou superior a 37,5°C) nas áreas de Maputo e de Xai-Xai, respectivamente, sendo os grupos etários mais afectados os dos 0 a 23 meses e 2 a 9 anos.

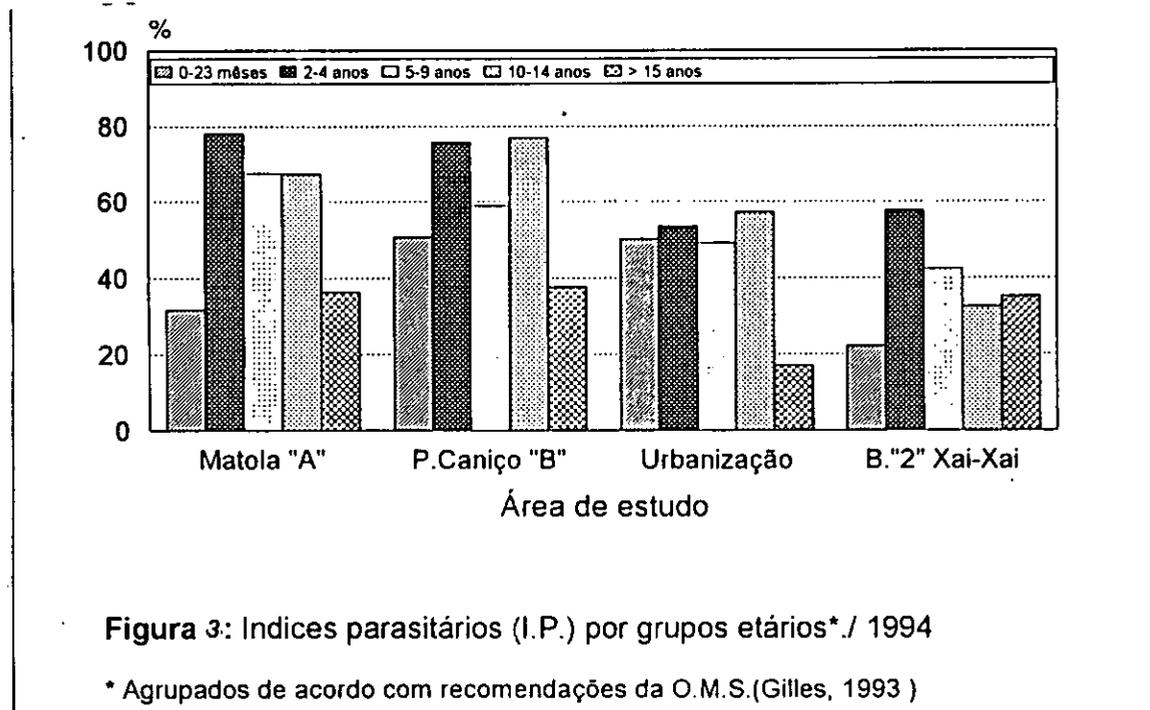


Figura 3: Índices parasitários (I.P.) por grupos etários*/ 1994

* Agrupados de acordo com recomendações da O.M.S.(Gilles, 1993)

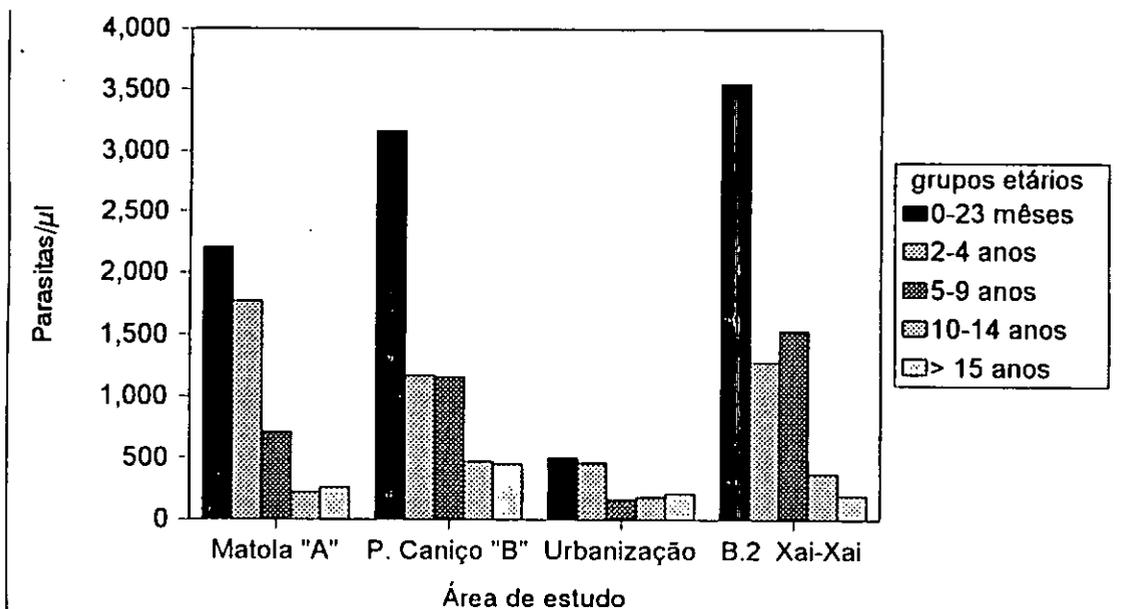


Figura 4: Médias geométricas das densidades parasitárias, por grupos etários e por área de estudo.

♦ 5.2. Características das amostras de Soro.

As amostras de soro para o estudo foram colhidas de indivíduos com infecção simples de *Plasmodium falciparum*.

A média das idades dos indivíduos residentes nas áreas de estudo da Província de Maputo há mais de 4 anos foi comparativamente menor (25.9 anos) que a dos indivíduos residentes nas áreas da Província de Maputo há menos de dois anos e na área da Cidade de Xai-Xai (28.1) ($X^2 = 0.16$, $p = 0.68$).

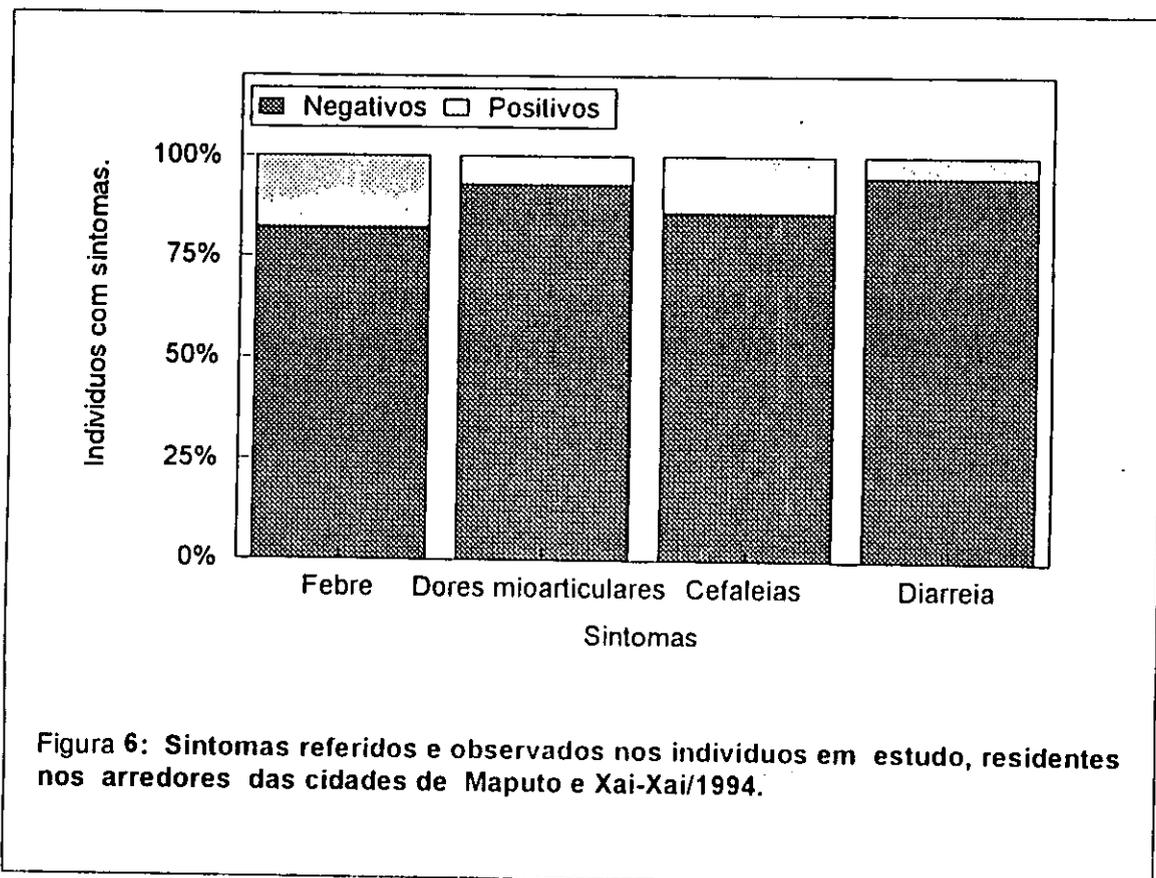
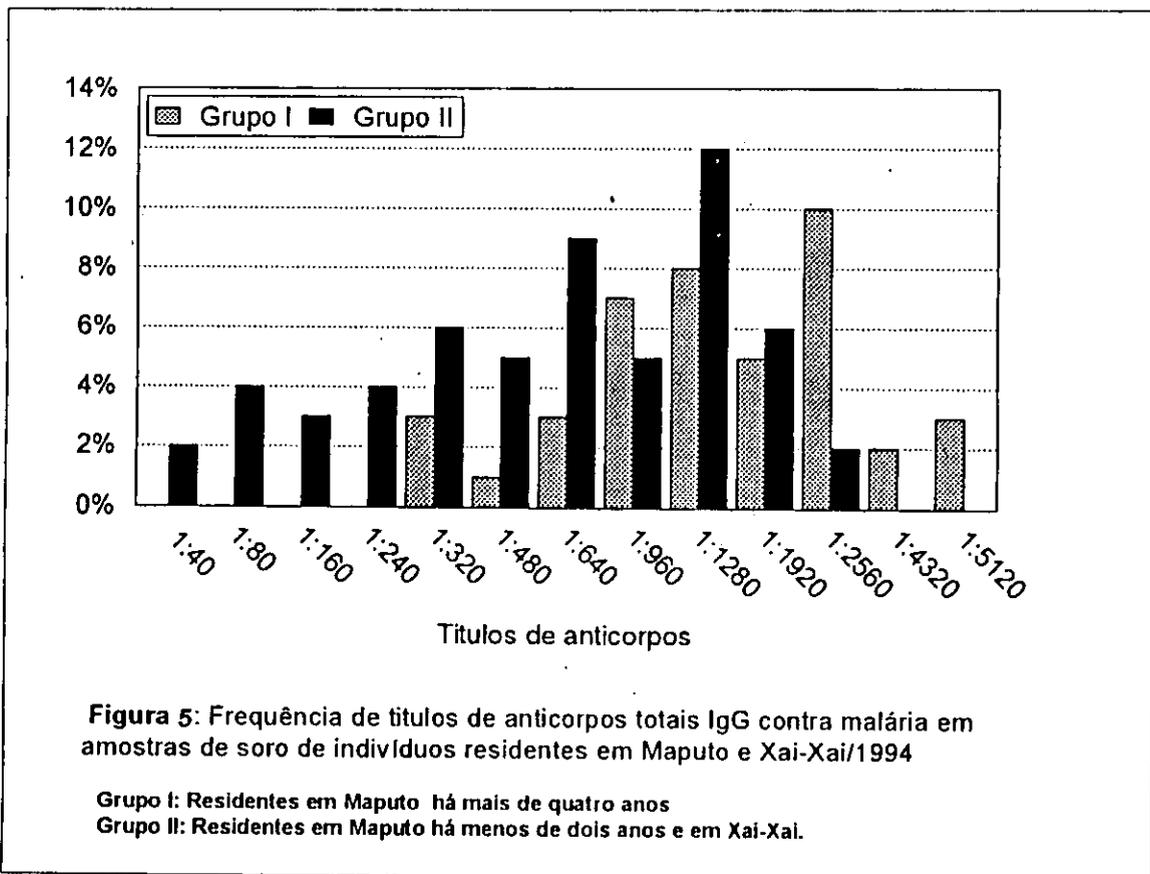
Foram detectados anticorpos IgG contra malária em todas as amostras, como demonstrado pelo teste de imunofluorescência indirecta, com títulos de anticorpos que variaram de 1:40 a 1:5120. Os níveis de anticorpos foram comparativamente maiores nos soros dos indivíduos do Grupo II, com títulos de anticorpos superiores a 1:320 em todas as amostras, contrariamente ao Grupo I onde 22.4% de indivíduos apresentaram títulos inferiores a 1:320 ($p = 0.004$) (Figura 5).

A base de selecção do soro controle foi o resultado negativo ao teste de imunofluorescência, com título de anticorpos IgG contra malária inferior a 1:20.

As médias geométricas das densidades parasitárias nos indivíduos dos quais foram colhidos os soros foram inferiores às densidades parasitárias da população, sendo de 116 parasitas/ μ l para o Grupo I e 117 parasitas/ μ l para o Grupo II ($p = 0.147$), variando as densidades parasitárias entre 32 a 25.119 parasitas/ μ l.

Os resultados do inquérito em anexo V mostram que as amostras de soro foram colhidas maioritariamente de indivíduos assintomáticos. Cerca de 82.0% de indivíduos não apresentavam febre (um dos sintomas base na identificação clínica da malária) na altura e duas semanas antes da colheita.

Entre os sintomas estudados, a febre referida e observada foi o mais prevalente, encontrada em 18.0% dos indivíduos em estudo. Foram também referidos e observados outros sintomas: cefaleias (14%), dores mioarticulares (7.0%) e diarreia (5.0%) (Figura 6).



♦ 5.3. Inibição do crescimento dos parasitas pelos soros testados.

Das 100 amostras colhidas, foram testados 95 soros para inibição do crescimento "in vitro" dos 4 isolados de *Plasmodium falciparum*. Os soros restantes não foram testados por insuficiência de amostras de isolados.

Todos os soros a serem testados demonstraram alguma capacidade de inibição, em oposição ao soro controle (comprovadamente não imune), que estimulou o crescimento dos parasitas especialmente a partir da concentração de 12,5% (Figura 7).

No entanto, com o aumento da concentração dos soros testados, a inibição tendeu a aumentar (Figura 7).

Das concentrações estudadas, a concentração na qual os soros testados mostraram já grande actividade inibitória (mais que 56.8% dos soros com inibição $\geq 30\%$) foi a de 12,5%, e os valores maximos foram atingidos a concentração de 25-50% (Figura 8).

Para determinar a capacidade de inibição de cada soro, 12% foi tomada como a concentração de trabalho para o teste. Como soros com capacidade de inibição foram considerados os que mostrassem uma capacidade de inibição superior a 30%. Valor a partir do qual se considerou que a inibição é devida a presença dos soros a testar e não a factores secundários inerentes à propria cultura.

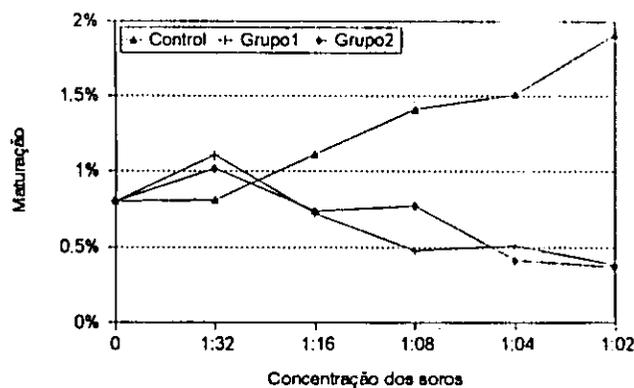
Os soros testados mostraram uma grande variabilidade entre si, em termos de capacidade de inibição dos diferentes isolados, com valores de inibição que oscilaram dos 0 a 90%, nas diferentes concentrações, o que pode ser ilustrado pelos valores de p entre os dois grupos de soros (Tabela 4).

Fazendo uma análise individual dos soros, na maior parte dos casos, os soros do Grupo I foram os que mostraram maior capacidade de inibição, em relação aos soros do Grupo II, colhidos de individuos residentes em área diferente da do isolado (anexos VII e VIII).

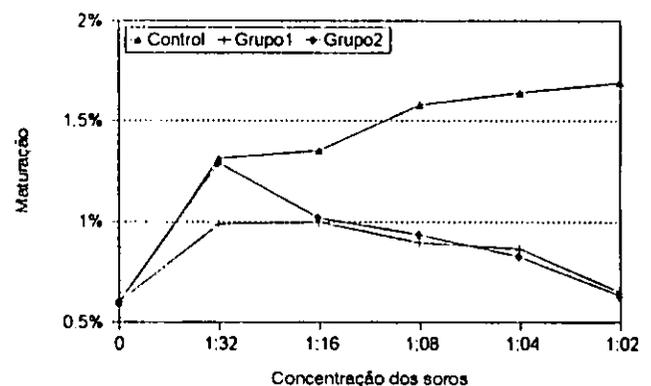
Contudo, comparando as percentagens médias de inibição dos soros homólogos (Grupo I) e heterólogos (Grupo II), quando testados com cada isolado, não houve diferenças estatisticamente significativas em relação a todos os isolados. Excepcionalmente, em relação ao isolado 7113 foi possível observar uma diferença estatisticamente

significativa na capacidade inibitoria entre soros homologos e heterologos ($p = 0.03$) (Tabela 4).

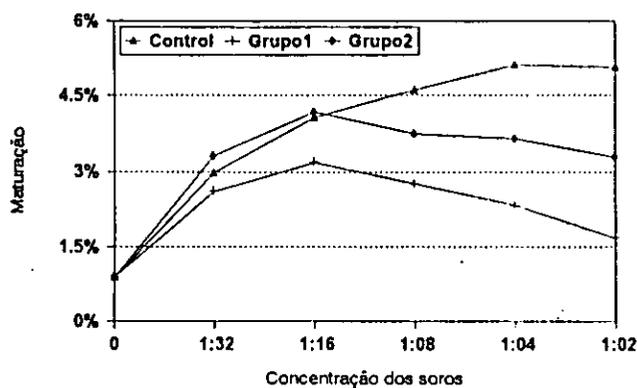
Os isolados não evidenciaram diferenças significativas entre si, quando cultivados em presença dos soros do grupo I e grupo II, as concentrações de 3 e 6%. Contudo, a diferença torna-se significativa nas concentrações de 12,5, 25 e 50% (Tabela 4).



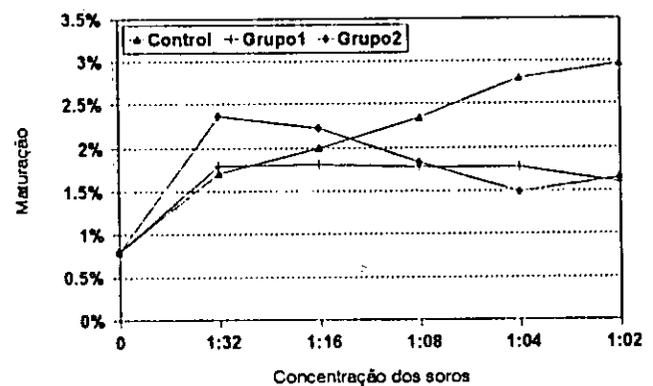
a) Isolado 333



b) Isolado 7112



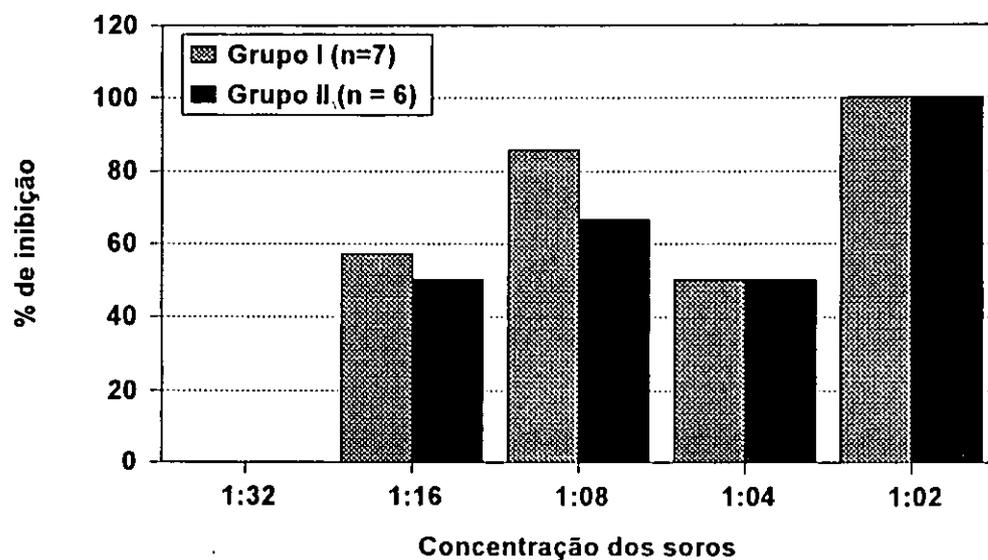
c) Isolado 7113



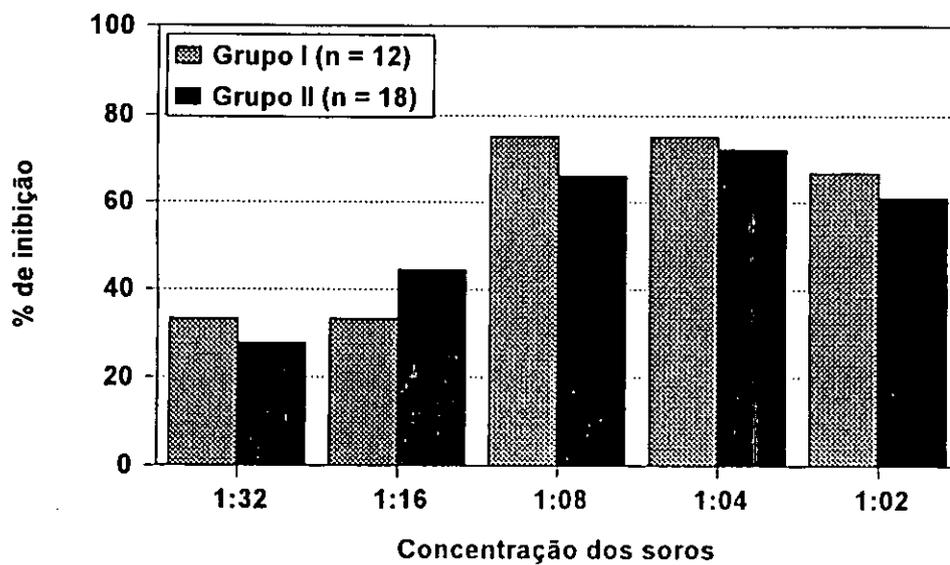
d) Isolado 666

Figura 7: Crescimento "in vitro" de *Plasmodium falciparum* em presença de soros colhidos na cidade de Maputo e Xai-xai / 1994

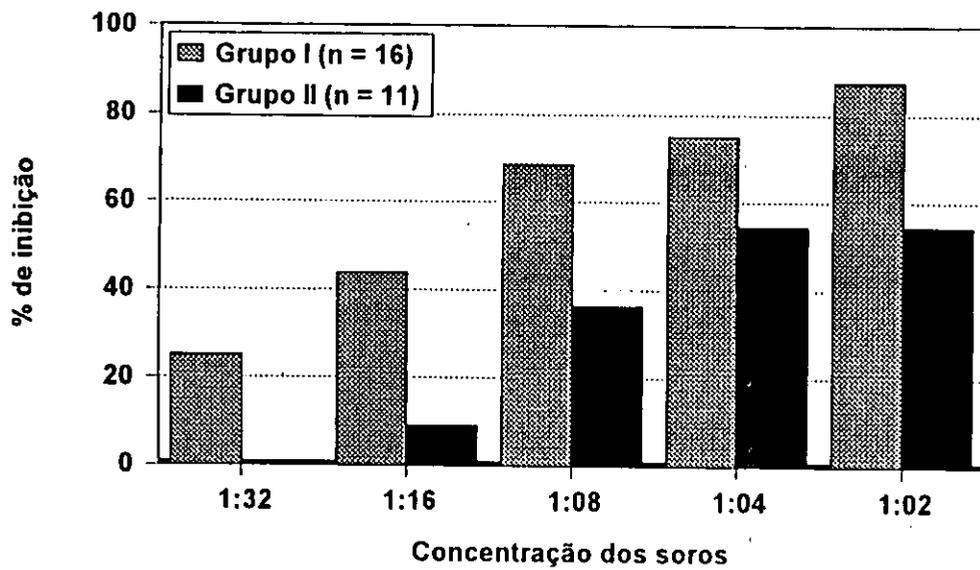
Grupo I = soros colhidos em indivíduos residentes em Maputo a mais de 4 anos.
 Grupo II = Soros colhidos em indivíduos residentes em Maputo a menos de 2 anos e em Xai-Xai.



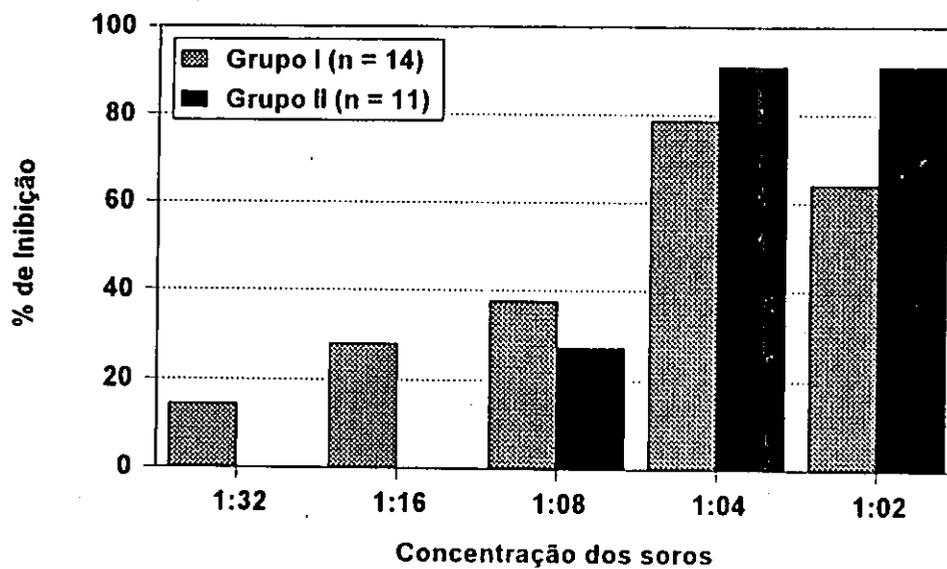
a) Isolado 333



b) Isolado 7112



c) Isolado 7113



d) Isolado 666

Figura 8: Frequência de soros com capacidade de inibição igual ou superior a 30%, nos dois grupos de soros testados

Grupo I: residentes em Maputo a mais de 4 anos
 Grupo II: residentes em Maputo a menos de dois anos e em Xai - Xai.

Tabela 4: Percentagem média da inibição dos soros dos Grupos I e II, à concentração de 12,5 %, para os diferentes isolados.

Isolado	Testes por Gupo				Valor de p
	Grupo I		Grupo II		
	n	Media de	n	Media de	
"333"	7	65.9	6	45.2	0.2
"7112"	12	44	18	42.5	0.8
"7113"	16	40.3	11	21.9	0.03
"666"	14	23.9	11	21.6	0.6
Total por	49 (51.6%)	40.2	46 (48.4%)	32.9	0.14
Valor de p	0.02		0.04		

Grupo I - Soros colhidos em individuos residentes na provincia de Maputo há mais de 4 anos.

Grupo II - Soros colhidos em individuos residentes na provincia de Maputo por periodo igual ou inferior a dois anos e na provincia de Gaza (Xai-Xai).

• **5.4. Relação entre densidades parasitárias, sintomas, título de anticorpos e inibição.**

Como seria de esperar a densidade parasitária dos individuos de quem provieram os soros mostrou uma correlação positiva com os sintomas ($r = 0.04$; $p > 0.05$), neste caso específico com a temperatura axilar (que se reflecte na ocorrência de febre, um dos sintomas base na indentificação da malária como doença). Por outro lado verificou-se uma relação negativa entre o título de anticorpos e a densidade parasitária ($r = -0.03$; $p > 0.05$) (Figura 9).

Apesar de mais uma vez não ser estatisticamente significativa ($r = -0.07$, $p > 0.05$), foi observada uma correlação negativa entre a densidade parasitária dos individuos dos quais se obtiveram os soros e as suas capacidades de inibição à concentração de 12.5%. Assim, os mesmos soros provenientes de individuos com alta densidade parasitária, que tenderam a apresentar uma temperatura corporal mais alta e um nível de anticorpos mais baixo foram os que evidenciaram menor capacidade de inibição.

Ainda procurando relacionar a capacidade de inibição com outras características dos soros testados verificou-se que amostras provenientes de indivíduos com febre, apesar de evidenciarem também uma considerável variação na capacidade de inibir o crescimento dos parasitas "in vitro" (20 a 90 %), mostraram uma tendência, que embora estatisticamente não significativa, para uma correlação negativa ($r = - 0.18, p > 0.05$), entre a temperatura axilar e a incapacidade de inibir o crescimento dos isolados do parasita "in vitro".

Apesar de uma maior frequência de altos títulos de anticorpos nos soros testados foi sómente observada uma débil correlação positiva entre o título de anticorpos e a capacidade de inibição pelos soros testados ($r = 0.15; p > 0.05$ e $0.10; p > 0.05$ para os Grupos I e II respectivamente). De facto, soros com títulos inferiores a 1:320 não mostraram menor capacidade de inibição e os com títulos iguais ou superiores a 1:1280 não tiveram necessariamente níveis de inibição superiores a 30% (Figura 10).

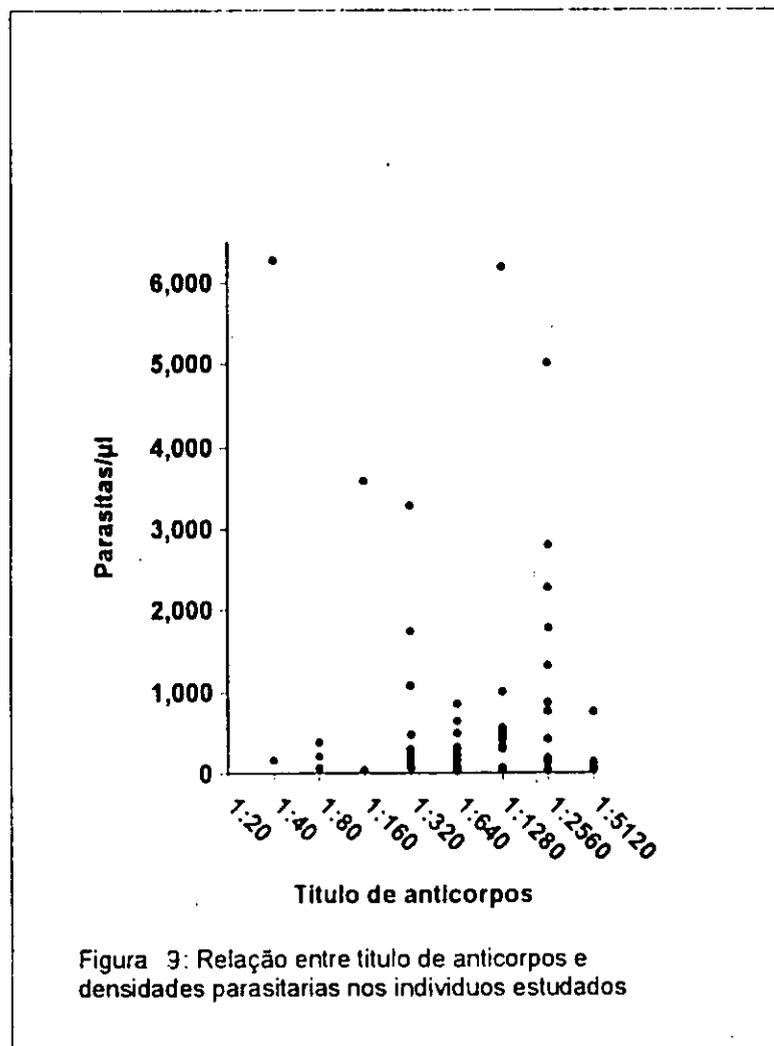


Figura 3: Relação entre título de anticorpos e densidades parasitarias nos individuos estudados

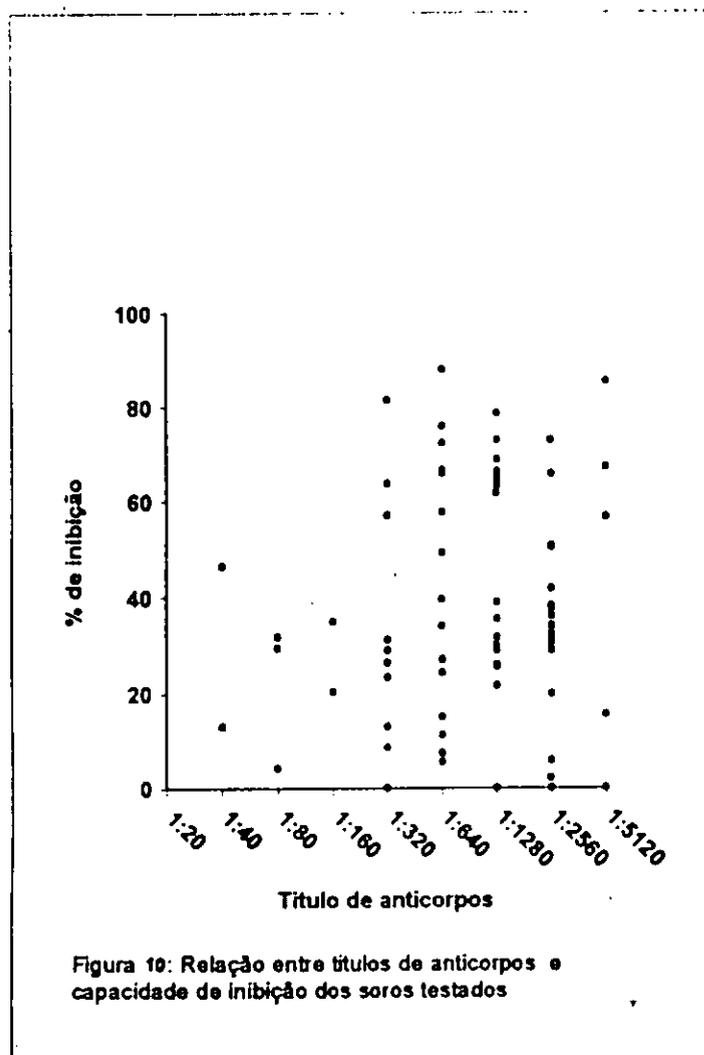


Figura 10: Relação entre títulos de anticorpos e capacidade de inibição dos soros testados

6. DISCUSSÃO

A análise dos dados dos inquéritos parasitológicos permite caracterizar as áreas estudadas como áreas hiperendemicas (Gilles 1993), em relação à malária causada por *Plasmodium falciparum*.

A distribuição relativa das diferentes espécies de *Plasmodium* encontrada neste estudo vai de acordo com a distribuição a nível nacional, em que o *Plasmodium falciparum* é a espécie mais frequente (Noticiário Epidemiológico 1992, Martinhenko 1994a).

Os resultados deste estudo, reflectem a situação de malária no início da época de transmissão (Novembro a Janeiro), visto que o maior número de casos ocorre normalmente após as principais chuvas (Fevereiro a Março), quando o número de mosquitos e a intensidade de transmissão são elevados. Estudos anteriormente feitos concluíram que na cidade de Maputo e arredores o período de alta transmissão oscila entre Fevereiro e Março. (Noticiário Epidemiológico 1992).

O facto de se terem encontrado índices parasitários baixos em Xai-Xai, comparativamente a Maputo, deve-se provavelmente as condições de transmissão menos favoráveis nesta área situada mais para o interior, em terreno elevado, em relação a cidade de Maputo situada na costa oceânica.

O observado aumento dos índices parasitários até ao grupo de 5 a 9 anos de idade, decrescendo nos grupos seguintes, é similar aos observados em outros estudos realizados em Moçambique (Schwalbach 1985, Direcção Nacional de Saúde/ Instituto Nacional de Saúde 1986, Noticiário Epidemiológico 1992, Franco *et al.* 1994, Martinhenko 1994b) e em outras partes do mundo (Petersen *et al.* 1991). Este fenómeno pode ser explicado pela já conhecida lentidão de desenvolvimento da imunidade contra a malária, o que faz com que as crianças sejam mais susceptíveis em relação aos adultos (Day e Marsh 1991, Gilles 1993, Knell 1994).

Os valores das densidades parasitárias encontrados neste estudo são baixos comparativamente aos encontrados em estudos feitos noutros países onde a transmissão de malária é muito intensa e perene (Petersen *et al.* 1991; Hogh *et al.* 1991). A densidade parasitária é um factor utilizado como indicador da intensidade de transmissão

da doença numa determinada população (Gilles 1993). As baixas densidades parasitárias observadas neste estudo, mostram que sendo a densidade parasitária indicadora do reservatório de parasitas para os mosquitos na população, pode-se afirmar, com base neste parâmetro, que a intensidade de transmissão nestas áreas, no período de estudo foi relativamente baixa. Estudos feitos também mostraram que a intensidade de transmissão nestas áreas é baixa (Schwalbach 1985, Martinhenko 1994b). No que diz respeito à distribuição das médias geométricas das densidades parasitárias por grupos etários verificou-se que o grupo etário dos 0-23 meses foi o mais afectado, o que mostra que as crianças são, de facto, o grupo mais vulnerável.

As médias geométricas das densidades parasitárias nos indivíduos dos quais provieram os soros foram comparativamente mais baixas que as médias na população de suas áreas de origem, o que era de esperar, dado que os soros foram colhidos apenas em indivíduos com idades superiores a 15 anos, nos quais uma imunidade contra os parasitas já está instalada. Como seria de esperar, as densidades parasitárias destes indivíduos, dos quais provieram os soros mostraram uma relação lógica, embora não significativa, com as outras características destes, na qual indivíduos com densidades parasitárias altas, tenderam a apresentar temperatura corporal mais alta e títulos de anticorpos baixos. Esta associação foi igualmente observada por Petersen et al 1991 e sugere que com o aumento da idade, há uma aquisição de imunidade que resulta de facto, num declínio considerável das densidades parasitárias e dos sintomas (febre).

A frequência de soros positivos para a presença de anticorpos IgG contra malária, nas amostras em estudo, está de acordo com os dados dos níveis de anticorpos encontrados em estudos anteriores realizados em Moçambique (Irulegui et al 1984) e em outros países da África (Petersen et al. 1989, Hogh 1991). Estes dados eram de prever pois as amostras foram colhidas em indivíduos com parasitas de malária e sabe-se que uma resposta serológica positiva pode ocorrer em casos de infecção presente ou anterior (Conhen 1970, McGregor e Wilson 1988).

Para além da presença de anticorpos IgG contra malária nas amostras de soros dos indivíduos em estudo, estas demonstraram também uma capacidade de inibir a multiplicação de isolados de *Plasmodium falciparum* "in vitro" que não foi observada quando os parasitas foram cultivados em presença do soro controle, não imune.

Resultados similares, foram observados em vários outros estudos, nos quais soros humanos demonstraram capacidade de inibir a multiplicação de diferentes estirpes de *P. falciparum* "in vitro" (Golenser et al 1982, Jesen et al 1982, Waa et al 1984, Chulay et al 1985; Lunel e Druilhe 1989). Esta acção inibitória dos soros mostra que os indivíduos nos quais estes foram colhidos, possuem de facto, soros com características imunes. De facto sabe-se que o crescimento dos parasitas "in vitro" e "in vivo", pode ser afectado pelos anticorpos ou outros componentes do sistema imunitário presentes em soros de indivíduos imunes (Cohen et al 1970).

Os soros foram testados a várias concentrações e o facto de a maioria dos soros terem demonstrado actividade inibitória igual ou superior a 30%, a partir da concentração de 12,5% permitiu definir os soros como inibidores ou não inibidores se mostrassem capacidade de inibição igual ou superior a 30% a esta concentração, que foi usada como padrão para as análises feitas.

O facto de os isolados terem demonstrado um padrão de crescimento semelhante, após 48 horas de cultura em presença de condições normais (ausência de soro imune), com um factor de crescimento aproximado a três (anexo VI) indica que a variação no grau de inibição pelos soros imunes foi devida a factores inerentes aos próprios soros e não a diferenças na capacidade de adaptação em culturas "in vitro", entre os diferentes isolados. Contudo, observando os valores da inibição provocados pelos soros dos dois grupos para os diferentes isolados nota-se que há diferenças entre os isolados, a partir da concentração de 12,5% , assim como há uma grande variação entre a capacidade de inibição por cada soro. Sabendo que os isolados foram colhidos na mesma área, estas diferenças mostram que a interpretação dos resultados dos testes de inibição não pode ser feita linearmente e que alterando o isolado provavelmente a capacidade de inibição pode-se alterar. Assim como sugerem também a hipótese da já citada variabilidade de estirpes que possivelmente pode ocorrer entre estirpes de uma mesma região.

Wilson e Phillips 1976, Sy et al 1990; Brown et al 1983 estudaram o efeito de soros colhidos em diferentes regiões na inibição de diferentes isolados de *P. falciparum*. Embora de modo não muito evidente, as suas hipóteses foram encontradas neste trabalho, onde de facto, ao estudar os soros individualmente e no caso dos soros testados contra o isolado 7113, observou-se que soros colhidos na mesma área que os

isolados (homólogos) mostraram maior capacidade de inibição comparada a dos soros colhidos em área diferente (heterólogos). Contudo, contrariamente ao que se esperava observar, estas diferenças não foram observadas quando os soros do Grupo I e II foram testados nos outros isolados, o que se deveu provavelmente ao facto dos soros do grupo II serem provenientes, maioritariamente de indivíduos residentes em Manhiça, Magude e Xai-Xai, que são regiões relativamente próximas à Cidade de Maputo, em termos de diferenças nos isolados que circulem nestas regiões.

As diferenças na capacidade de inibição feita pelos soros homologos e heterologos observadas no isolado 7113 e na análise individual dos soros, mostram que de facto, indivíduos imunes residentes em áreas relativamente próximas podem mostrar diferenças nas suas respostas imunológicas dependendo da estirpe do parasita e que um indivíduo com alta protecção contra as estirpes que circulam na sua região pode ter menor protecção contra as estirpes que circulam noutras regiões.

Esta diferença no efeito inibitório está ainda de acordo com a ideia de que ocorrem várias estirpes de *Plasmodium falciparum* dentro de áreas definidas e entre regiões geográficas separadas e pode explicar a hipótese segundo a qual a aquisição dos factores protectores presentes no soro de indivíduos imunes depende de exposição prolongada e repetida aos antígenos de *Plasmodium falciparum* (Day e Marsh 1991).

Considerando que algumas amostras foram recolhidas de indivíduos deslocados, que se encontravam a residir nas áreas de estudo da província de Maputo por período inferior a dois anos, estas diferenças na capacidade de inibição pelos soros dos dois grupos levam-nos a admitir a ideia de que as movimentações em massa das populações podem resultar num aumento do risco de adquirir a doença, devido ao facto de o sistema imunitário dos emigrantes provavelmente não reconhecer as novas variantes do parasita encontradas na nova região, como mostra a fraca capacidade inibitória dos seus soros. De facto, Martinhenko (1994a), cita o afluxo de deslocados dos distritos para as capitais provinciais como um dos factores, entre outros, que estaria na origem da evolução da situação de malária em Moçambique nos últimos anos (1989 -1992). Estudos realizados no Brasil (Marques 1987); e na Índia (Kumar et al 1991, Mathur et al. 1992) também citam as migrações como possíveis causas do aumento do número de casos de malária nas áreas estudadas.

Por outro lado, sabe-se que as movimentações em massa das populações podem causar uma possível introdução, na nova área, de novas variantes antigénicas de *P. falciparum*, o que por sua vez poderia causar a chamada "mistura antigénica" entre as estirpes das diferentes regiões (Terry 1988), resultando em algumas variantes antigénicas que seriam novas para o sistema imunitário dos dois grupos de indivíduos. Este facto poderá explicar as diferenças nos graus de inibição entre os isolados assim como o facto de não se terem observado diferenças tão marcantes entre as médias da inibição feitas pelos soros dos dois grupos de soros, para alguns casos.

Jensen et al (1983), Nkuo e Deas (1988), observaram que soros provenientes de indivíduos sem sintomas clínicos da malária mostram uma significativa capacidade de inibir o crescimento de *P. falciparum* "in vitro" comparada a dos soros provenientes de indivíduos com sintomas. Neste estudo, embora não significativa esta correlação foi evidente, com soros provenientes de indivíduos com temperaturas axilares e densidades parasitárias mais altas a demonstrarem menor capacidade de inibição, o que sugere que nestes indivíduos os factores imunitários não são suficientes para diminuir a população parasitária e mostra uma relação importante entre os efeitos observados "in vivo" e a capacidade de inibição.

Em relação aos soros que embora provenientes de indivíduos com temperaturas axilares altas (febre), tiveram capacidade de inibir o crescimento dos parasitas, uma explicação possível poderá ser o facto de nestes indivíduos as manifestações de febre serem provavelmente resultantes de um contacto muito recente com uma nova estirpe do parasita (Lines e Armstrong 1992). Outra hipótese poderá ser a possível necessidade de factores adicionais que juntamente com os anticorpos possibilitem uma protecção total (Lunel e Druilhe 1989).

À semelhança dos resultados de Golenser et al 1982, Jensen et al 1983a, Jensen et al 1983b e Sy et al 1990, nos dados deste estudo, não houve relação entre o título de anticorpos e a capacidade de inibição dos soros imunes (alguns soros com títulos de anticorpos superiores a 1:1280 não inibiram o crescimento dos parasitas "in vitro"). Uma possível explicação para o facto de os soros não inibirem o crescimento dos parasitas, tendo anticorpos altos poderá ser o facto da acção dos anticorpos ser específica para diferentes estirpes do parasita ou seja anticorpos que inibem a multiplicação de um

isolado podem não inibir o crescimento de outro isolado. Outro factor é a existência de variantes antigénicas diferentes entre as estirpes de *P. falciparum*, sendo necessário um contacto previo com as diferentes variantes, para o desenvolvimento de imunidade antiparasitária contra o *Plasmodium* (Day e Marsh 1991, Knell 1991). Por outro lado, os anticorpos podem estar presentes no soro do indivíduo mas não terem capacidade protectora e portanto serem incapazes de inibir o crescimento dos parasitas, sendo difícil a distinção de anticorpos protectores dos não protectores. Daí que estes resultados sugerem que possivelmente o título de anticorpos nos indivíduos em estudo é mais um indicador do grau de exposição ou de exposição recente ao parasita e não um indicador de protecção contra a doença ou de imunidade clínica.

7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Através dos resultados deste estudo obteve-se informação sobre as características imunitárias de indivíduos residentes em áreas endémicas nos arredores das cidades de Maputo e de Xai-Xai, incidindo fundamentalmente na acção de seus soros sobre isolados de *P. falciparum* em culturas "in vitro".

Pode-se concluir que os resultados dos testes de inibição do crescimento de isolados de *P. falciparum* "in vitro", não podem ser analisados de modo similar, pois estes variam de acordo com os isolados em estudo e com as características de cada soro, por este facto sugere-se que em trabalhos futuros sejam caracterizadas os isolados em estudo para melhor interpretação dos resultados obtidos.

Os resultados permitiram concluir, que indivíduos adultos residentes em áreas com malária endémica nos arredores da Cidade de Maputo e de Xai-Xai, desenvolvem mecanismos imunitários de defesa contra os parasitas causadores desta doença, que foram demonstrados pela capacidade de seus soros de inibir o crescimento de *Plasmodium falciparum* "in vitro". Estas características imunes nestes indivíduos foram também demonstradas pela presença de anticorpos IgG contra malária em seus soros, quando testados pelo teste de imunofluorescência.

Os dados obtidos mostraram, embora de modo não muito evidente, existir diferenças entre a inibição feita pelos soros homologos (colhidos na mesma região que o isolado) que tiveram maior capacidade inibitória em relação aos soros heterologos ou obtidos em região diferente a dos isolados. Este resultado demonstra que a reinfecção com uma estirpe semelhante da infecção anterior dá maior protecção do que a infecção com estirpes diferentes pelo que os indivíduos semi-ímmunes residentes em Maputo há mais de 4 anos têm aparentemente maior protecção contra os isolados que circulam nesta região do que os indivíduos recém chegados de outras regiões.

Neste estudo, foi ilustrada uma possível relação entre baixa capacidade de inibição em indivíduos com densidades parasitárias altas e temperaturas axilares (febre) igualmente altas, não se tendo observado, por outro lado uma correlação significativa entre os títulos de anticorpos e a capacidade de inibição pelos soros ímmunes o que revela que nestes indivíduos a presença de anticorpos não é um indicador de protecção total contra a doença.

8. BIBLIOGRAFIA.

- Brown, K.N. (1971). Protective immunity to malaria provides a model for the survival of cells in an immunologically hostile environment. Nature, 230: 163-167.
- Brown, G.V.; F.R. Anders; F.G. Mitchell e F.P. Heywood (1982). Target antigens of purified human immunoglobulins which inhibit growth of *Plasmodium falciparum* "in vitro". Nature, 297: 591-593.
- Brown, G.V.; F.R. Anders e G. Knowles (1983). Differential effect of immunoglobulin on the "in vitro" growth of several isolates of *Plasmodium falciparum*. Infection and Immunity, 39(3): 1228-1235.
- Chulay, J.D.; J.D. Haynes e C.L. Diggs (1985). Serotypes of *Plasmodium falciparum* defined by immune serum inhibition of "in vitro" growth. Bulletin of the World Health Organization, 63(2): 317-323.
- Cohen, S.; G.A. Butcher e R.B. Crandall (1969). Action of malarial antibody "in vitro". Nature, 223: 368 - 371.
- Cohen, S.; I.A. McGregor e S. Carrington (1970). Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. Nature, 192: 733-737.
- Day, K.P. e K. Marsh (1991). Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. Parasitology Today, 7: A68-A71.
- Deans, J.A. e S. Cohen (1983) Immunology of malaria. Annual Review of Microbiology, 37: 25-49.
- Deloron, P. e C. Chougnet (1992). Is immunity to Malaria really Short-lived?. Parasitology Today, 8(11): 375-378.
- Direcção Nacional de Saúde / Instituto Nacional de Saúde (1986). Relatório de actividades de luta anti - malarica em Moçambique, Misau, Maputo.
- Druilhe, P.; O. Pradier; J.P. Marc; F. Miltgen; D. Mazier e G. Parent (1986). Levels of Antibodies to *Plasmodium falciparum* Sporozoite Surface Antigens reflect malaria

transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. Infection and Immunity, 53 (2): 393-397.

Esposito, F.; S. Lombardi; D. Modiano; F. Zavala; J. Reeme; L. Lamizana; M. Coluzzi e R.S. Nussenzweig (1988). Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection. Transactions of The Royal Society of Tropical medicine and Hygiene, 82: 827-832.

Franco, L. A.; S. Rubio e A. Barreto (1994). Dinâmica da malária numa área de saúde da Cidade de Maputo. Parte II. Revista Médica de Moçambique, 5(2): 23 - 29.

Gilles, H. M. (1993). Epidemiology of malaria. In: Gilles, H.M. e D.A. Warrell (editores). Bruce-Chwatt's Essential Malariology, 3ª Edição. pp 124 - 164. London Boston Melbourne Auckland.

Golenser, J.; J. Miller, H. Avraham e D.T. Spira (1983). The inhibition effect of human immune sera upon the "in vitro" development of *Plasmodium falciparum*. Tropical and Geographical Medicine, 35: 15-20.

Good, M.F. e L.H. Miller (1989) Involvement of T cells in malaria immunity: implications for vaccine development. Vaccine, 7: 3-9.

Hogh, B.; N.T. Marbiah; E. Petersen; H. Perlmann; E. Dolopaye; A.P. Hanson; A. Bjorkman e P. Perlemann (1991). A longitudinal study of seroreactivities to *Plasmodium falciparum* antigens in infants and children living in a holoendemic area of Liberia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 44(2): 191-200.

Howard, R. J. (1992). Asexual deviants take over. Nature, 357: 647 - 648.

I.N.S. (1989) Manual de microscopia de malária, 55pp. Ministério de Saúde, Central Impressora.

Irulegui, I.; M. M. Manuel e L. Rey (1984). Inquérito - Soro epidemiológico da malária na região do rio Limpopo, Moçambique. Revista Médica de Moçambique, 2(1): 40 - 48.

Jeffery, G.M.(1966). Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of *Plasmodium*. Bulletin of the World Health Organization, 35: 873-882.

Jensen, J.B., M.T. Boland, M. Hayes e M.A. Akood (1982) *Plasmodium falciparum*: Rapid assay for *in vitro* inhibition due to Human serum from residents of malarious areas. Experimental Parasitology, 54: 416-424.

Jensen, J.B., M.T. Boland, J.S. Allan, J.M. carlin, J.A.V. Waa, A.A. Divo, e M.A.S. Akood (1983) Association between Human serum-induced crisis forms in cultured *Plasmodium falciparum* and clinical immunity to malaria in Sudan. Infection and Immunity, 41(3): 1302-1311.

Jepsen, S. (1983). Inhibition of *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* by purified antimalarial Human IgG antibodies. Scand. J. Immunol, 18: 567-571.

Lines, J. e J.R.J. Armstong (1992), For a few parasites more: inicum size, vector control and strain - specific immunity to malaria. Parasitology Today, 8: 381 - 383.

Lunel, F. e P. Druilhe (1989) Effector cells involved in nonspecific and antibody-depedent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. Infection and Immunity, 57 (7): 2043-2049.

Knell, A.J. (1991) Malaria: A publication of the tropical programma of the Wellcome Trust, 88pp. Oxford, Oxford University Press.

Kumar, A.; V. P. Sharma e D. Thavaselvam (1991) Malaria related to constructions in Panaji, Goa. Indian Journal of Malariology, 28: 219 - 225.

Malaria em Moçambique(1992): Noticiário Epidemiológico. 1(11) , Maputo, Misau

Marques, A.C. (1987) Human migration and the spread of malaria in Brazil. Parasitology Today, 3 (6): 166 -170.

Marsh, K.; L. Otoo; R. J. Hayes; D.C. Carson e B. M. Greenwood (1989). Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to

protection against infection. Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene, 83: 293 - 303.

Martinenko, V. (1994a) Malária em Moçambique. Direcção Nacional de Saude, Secção de Malaria (documento não publicado).

Martinhenko, V.; M. Dgedge; A. Jarov; N. Cuamba (1994b): Incidencia de Malaria na cidade de Maputo. I.N.S., MISAU, Maputo (Documento não publicado)

Mathur, K. K.; G. Harpalani; N. L. Kalra; G. G. G. Murthy e M. V. V. L. Narasimham (1992) Epidemic of malaria in Barmer district (Thar Desert) Rajasthan during 1990. Indian Journal of Malariology, 29: 1-10.

McGregor, I.A. e S.P. Carrington (1963). Treatment of East African *P. falciparum* malaria with West African Human γ -globulin. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 57: 170-178.

Mcgregor I. S. e R. M. Wilson (1988) Specific immunity aquired in man. In: Wernsdorfer, W.H. e S.I. McGregor, (editores). Malaria Principles and Practice of Malariology, Volume 1 pp 559 - 617. Edinburgh London Melbourne e New York, Churchill Livingstone.

Mount, D.L., B.L. Nahlen, C.L. Patchen, C.F. Churchill (1989). Adaptations of the Saker-Salomon's test: Simple, Reliable colorimetric field assays for Cloroquine and its metabolites in urine. Bulletin of the World Health Organization, 67(3): 295-300.

Nkuo, T.K. e J. E. Deas (1988). Sera from Cameroon induce crisis forms during *Plasmodium falciparum* growth inhibition studies "in vitro". Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 82: 380 - 383.

Petersen, E.; B. Høgh; H. Perlmann, L. Kabilan; M. T. Blomberg; N. T. Marbiah; A. P. Hanson; A. Bjorkman e P. Perlemann (1989). An epidemiological study of humoral and cell - mediated immune response to the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA in adult Liberians. Am. J. Trop. Med. Hyg., 41(4): 386 - 394.

- Petersen, E.; B. Høgh; N.T. Marbiah; K. David e A. P. Hanson (1991) Development of immunity against *Plasmodium falciparum* malaria: Clinical and parasitologic immunity cannot be separated. Journal of Infectious Diseases, 164: 946 - 953.
- Rosner, B. (1986). Fundamentals of Biostatistics. 2ª edição, 584pp. Boston Massachusetts, PWS Publishers.
- Schwalbach, J.; M. Maza (1985): A malaria em Moçambique: 1937-73, Maputo, Misau.
- Stanley, H.A. e R.T. Reese (1984) "In vitro" inhibition of intracellular growth of *Plasmodium falciparum* by immune sera. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 33(1): 12-16.
- Sy, N.E., R.B. Oberst, P.S. Macalagay, V.D. Fallarme, S.F. Cruzada e L.W. Laughlin (1990) *In vitro* growth inhibition of *Plasmodium falciparum* by sera from different regions of the Philippines. American Journal of Tropical medicine and Hygiene, 43(3): 243-247.
- Tapchaisri, P.; Y. Chomcharn; C. Poonthong; A. Asavanich; S. Limsuwan; O. Maleevan; S. tharavanij e T. Harinasuta (1983). Anti-sporozoite Antibodies induced by natural infection. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32(6): 1203-1208.
- Terry, R.J.(1988). Evasion of host immunity in malaria infections. In: Wernsdorfer, W.H. e S.I. McGregor, (editores). Malaria Principles and Practice of Malariology., Volume 1 pp 639 - 646. Edinburgh London Melbourne e New York, Churchill Livingstone.
- Voller, A. (1988) . The immunodiagnosis of malaria. In: Wernsdorfer, W.H. e S.I. McGregor, (editores). Malaria Principles and Practice of Malariology., Volume 1 pp. 815 - 825. Edinburgh London Melbourne e New York, Churchill Livingstone.
- Waa, J.A.V., J.B. Jensen, M.S.A. Akood, e R. Bayoumi (1984) Longitudinal study on the *in vitro* immune response to *Plasmodium falciparum* in Sudan. Infection and immunity, 45(2): 505-510.
- Weidanz, W.P. e C.A. Long (1988) The role of T cells in immunity to malaria. Prog. Allergy, 41: 215-225.

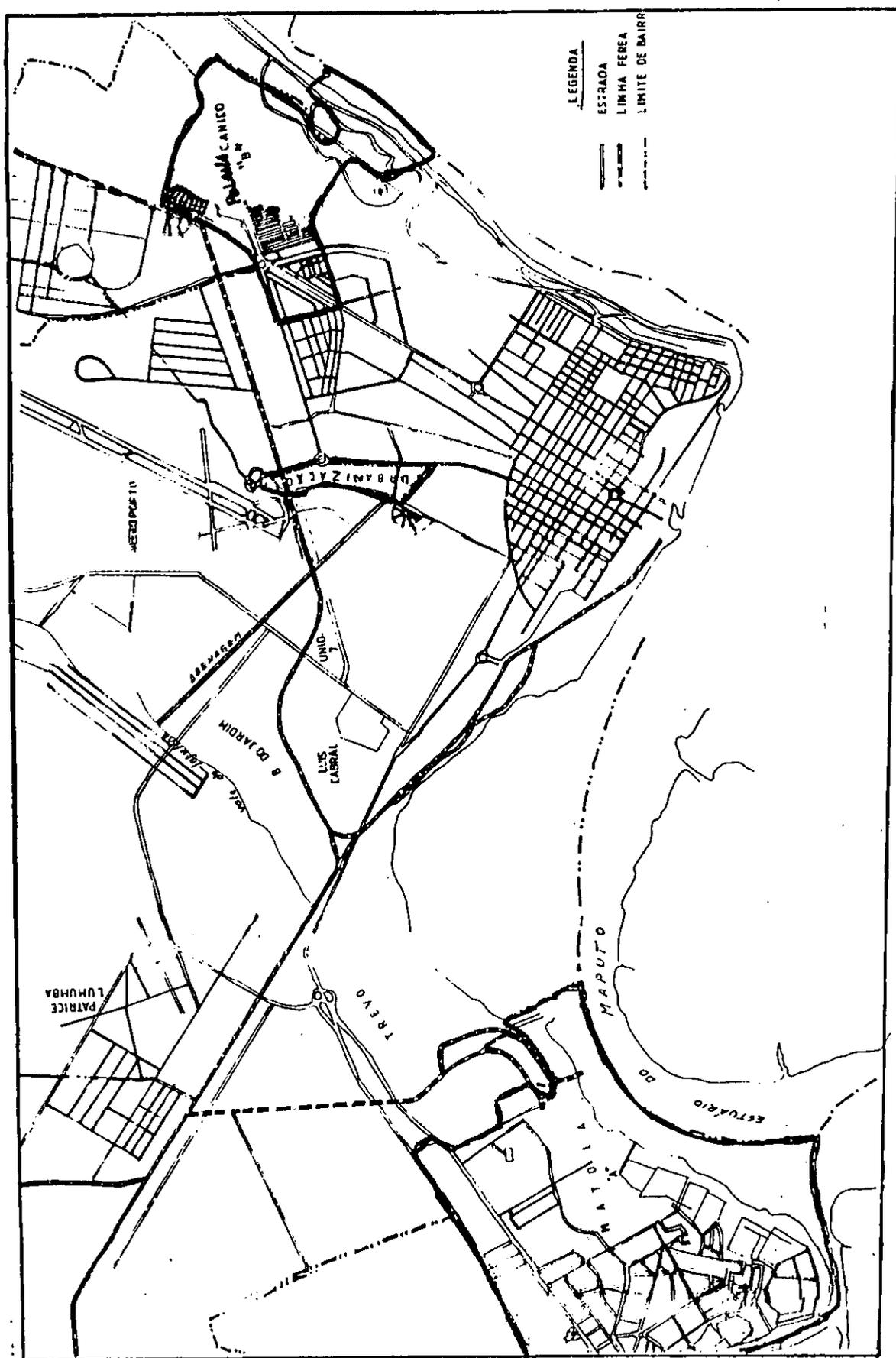
W.H.O. (1994). World malaria situation in 1992, Part1. Weekly Epidemiological Record, 69: 309 - 316.

Wilson, R.J.M. e R.S. Phillips (1976) Method to test inhibitory antibodies in Human sera to wild populations of *Plasmodium falciparum*. Nature, 263: 132-134.

Wonnacott, T.H. e R.J. Wonnacott (1990). Introductory Statistics. 5ª edição. 711pp. New York Chichester Brisbane toronto Singapore, John Willey e Sons.

9. ANEXOS

- Anexo I: Localização geográfica das áreas de colheita das amostras, na cidade de Maputo.



• **Anexo II: Cálculo das densidades parasitárias.**

A densidade parasitária ou quantidade de parasitas presentes nas células sanguíneas dos indivíduos infectados é um parâmetro avaliado nas populações estudadas que permite conhecer a intensidade da infecção do indivíduo. Quando calculada a média das densidades parasitárias da amostra dá-nos uma ideia do nível de transmissão da doença nestas populações.

A densidade parasitária pode ser calculada com base numa comparação entre a quantidade de parasitas e a quantidade de leucócitos num certo número de campos microscópicos. Esta, pode ser calculada facilmente quando se conhece o número de leucócitos por microlitro de sangue.

Após a contagem microscópica dos parasitas, que termina quando são atingidos 500 parasitas ou 500 leucócitos, o resultado é apresentado sob a forma: X parasitas assexuados / Y leucócitos. Feita a contagem, a densidade parasitária (P) é calculada facilmente pela fórmula:

$$P = (X \text{ parasitas assexuados} / Y \text{ leucócitos}) \times 8000 \text{ Leucócitos.}$$

Onde:

P = Densidade parasitária por microlitro de sangue.

X = Número de parasitas assexuados presentes em Y.

Y = Número de leucócitos.

Na maioria dos casos a contagem dos parasitas não é acompanhada pela contagem do número de leucócitos presentes por microlitro de sangue. Sabe-se no entanto, que um indivíduo normal tem 4000 a 10000 leucócitos por microlitro de sangue, número que mantém-se em caso de infecção por malária (I.N.S, 1989). Pelo que estabeleceu-se como convenção, em Moçambique, que o cálculo das densidades parasitárias se deve basear numa presunção de 8000 leucócitos por microlitro.

♦ **Anexo III: Teste de detecção de cloroquina e seus derivados na urina (Teste de Saker- Solomon's).**

A população em estudo foi seleccionada, entre outros factores, pela ausencia da presença de cloroquina e seus metabolitos na urina de cada individuo.

A detecção foi feita por um método colorimetrico usado facilmente no campo, adaptado a partir do teste de "Saker Solomons" (Mount, D.L., et al, 1989).

O teste baseia-se no uso de tetrabromophenolphthaleina etil ester (TPBEE), um reagente colorimetrico que se liga a cloroquina ou seus derivados produzindo uma cor vermelha purpura. O limite de detecção é de 14 dias após a ingestão da droga e de 1 ug/ml.

Técnica

- Num tubo de vidro com tampa, adicionar 1 ml de Tampão fosfato a PH 8.0.
- Misturar 200 ul de TBPEE a 0,05% em cloroformio.
- Adicionar 2 ml da urina a testar.
- Agitar, suavemente, as soluções durante 20 segundos e deixar em repouso durante 15 minutos.
- Proceder a leitura macroscopicamente.

O teste é positivo se o sedimento tiver uma cor vermelha purpura e negativo se esta for amarela esverdeada.

♦ Anexo IV: Esquema da composição da placa de microtitulação usada nos testes de inibição "in vitro"

	C	3%	6%	12%	25%	50%	C	3%	6%	12%	25%	50%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Colunas "1" e "7" = Meio RPMI 1640 contendo 5% de soro humano não imune

Colunas "2-6" e "8-12" = Concentrações dos soros imunes a testar

Fila "A" = Control

Fila "B-H" = Análise das amostras de soros imunes

♦ Anexo V: Ficha de inquérito sobre dados pessoais e clínicos dos indivíduos testados

DADOS PESSOAIS:

Bairro: _____ Quartelrão: _____ Casa: _____
 Nome _____ Idade _____ Sexo _____

Há quanto tempo reside na região? _____

Onde residia anteriormente? Província _____ Distrito _____ Localidade _____

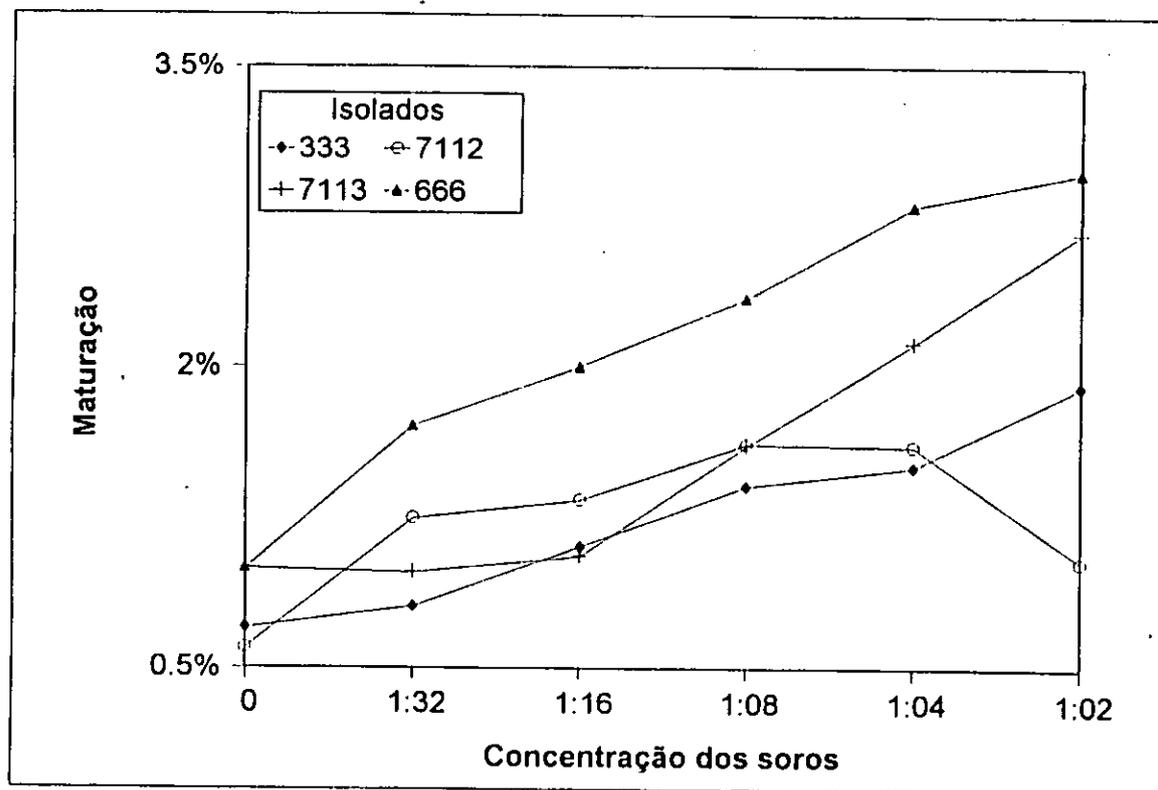
Dados Clínico-laboratoriais actuais e Dados clínicos retrospectivos

Febre		Antipiréticos		Cefaleias			Dores Mioarticulares		Arrepios		Tosse		Diarreia/ Perturbações Intestinais		Vómitos/ Nauseas		Colicas abdominais		Convulsões com Febre		Prostração		
Ref.	Obs.	Ref.	Ref.	Obs.	Ref.	Obs.	Ref.	Obs.	Ref.	Obs.	Ref.	Obs.	Ref.	Obs.	Ref.	Obs.	Ref.	Obs.	Ref.	Obs.	Ref.	Obs.	

Plasmodio _____

Teste de urina _____

♦ Anexo VI: Crescimento "in vitro" dos diferentes isolados em presença do soro não imune após 48 horas em cultura



- ♦ Anexo VII: Inibição do crescimento dos diferentes isolados pelos soros colhidos em indivíduos residentes em Maputo por período igual ou superior a 4 anos (Grupo I).

Soro	% de inibição a diferentes concentrações				
	1:32	1:16	1:8	1:4	1:2
1	0	0	0	20.3	34.9
2	0	0	61.6	71.2	79.2
3	4	13.5	39.6	65.8	88
4	2.7	6.8	34	42.3	55.4
5	28.8	48.7	57.7	81.6	90.3
6	48.9	33.2	49.2	50.3	19.4
7	36.1	49.2	31.8	87.6	89.9
8	16.5	18.2	7.3	19.9	54.1
9	34.1	36.9	22.9	0	6.8
10	19	16	13	27.7	53.3
11	0	34.4	57	86.1	92
12	54.5	62.3	64.8	69.5	73
13	4	26.6	63.7	83.3	84.7
16	0	0	29	7.9	88.5
17	0	0	20.3	23.6	30.7
18	0	19.4	12.9	25.4	36.5
19	23.4	9	68.7	66.2	69.6
20	0	3.6	26.4	40.8	66.5
22	13.5	14.9	23.4	21.1	20.1
24	0	0	4.2	51.7	22.8
25	0	63	65.9	82.7	69.4
26	30.4	43	46.5	0	9.4
28	0	0	35.4	33.2	72.1
29	0	0	14.9	33.9	21.5
30	0	13.5	26	38.5	28.6
31	0	9.7	33.9	43.4	30.7
32	0	4.5	29	42.8	62.9
33	0	20.7	66.6	52.9	79.5
34	0	58.5	78.7	89.4	92.6
35	0	0	5.5	47.5	33.6

Soro	% de inibição a diferentes concentrações				
	1:32	1:16	1:8	1:4	1:2
39	0	0	8.5	12.1	31.3
40	0	23	29.4	12.4	51.1
41	48.5	17	11.1	45.7	57.5
42	0	73.8	81.4	88.1	77.8
43	21.6	50.4	66.3	64.6	72.3
44	2.9	37.5	25.6	45.7	51.5
45	0	4.1	50.7	82.2	64
46	28	26.5	35	45.7	66.3
48	39.2	41	75.9	57.7	53.8
49	2.9	30.4	31.6	48.9	65.6
54	13.5	62.1	87.9	91.3	92.1
58	63.2	52.9	83.9	91.3	79.8
61	19.2	19.4	38.2	54	71.1
68	40	26.1	37.6	31.6	17.3
69	0.7	0	32.2	46.1	23.4
70	33.5	64.1	58	43.4	30.7
71	19.5	25.5	30.3	32.9	0.8
101	1.2	38.7	64.5	72.8	87.9
104	25.1	30	32	52.8	69.3

- ♦ Anexo VIII: Inibição do crescimento dos diferentes isolados pelos soros colhidos em indivíduos residentes em Maputo por período igual ou inferior a 2 anos e em Xai- Xai (Grupo I I).

Soro	% de inibição nas diferentes concentrações				
	1:32	1:16	1:8	1:4	1:2
14	33.3	58.3	72.9	55.6	61.7
15	0	16.9	28.8	43.9	31.4
21	0	0	0	11.9	12.8
23	0	0	2.1	20.1	17.5
27	0	2.7	19.8	66.2	86.3
36	28.9	76.6	65.8	84.4	75.6
37	35.5	36.4	63.2	62.2	77.3
38	0	0	50.3	77.4	80.1
47	0.7	18.2	5.8	8.3	29.5
52	0.9	18.5	4.6	39	33.6
55	0	26.1	27.1	74.5	54.8
56	0	0	0	0	24
57	0	20	21.7	69.6	78.7
60	0	0	23	53.2	33.6
62	0	17.1	41.8	61.5	79
66	0	45.9	72.3	61.5	69.9
67	29.3	40.1	36.8	52.1	46.4
72	49.2	45.2	56.7	82.6	90.4
77	21.3	18.2	30.7	40.2	46
78	35.2	50	67.2	82.6	67.3
79	7	15.5	27.3	32	16.4
80	0	0	22.6	47.1	53.3
81	68.1	76.1	85.5	91.3	82.6
82	52.7	80.5	72.2	63.3	31.7
83	12.3	52.5	67.7	77.2	83.4
84	0	0	24.3	49.2	46.8
85	0	0	36.1	3.1	26.7
86	0	15.3	33.5	36.5	20.8
87	0	0	0.6	6.2	20.1

Soro	% de inibição nas diferentes concentrações				
	1:32	1:16	1:8	1:4	1:2
88	0	0	0	0	0
89	0	0	40.5	45.3	60.9
90	0	0	8.9	41.4	44.4
91	0	0	15.4	20.3	0
92	0	0	0	13.8	37.9
93	0	0	11.1	25	22.2
94	0	10.5	13.4	15.4	35.1
95	0	15.3	33.5	36.5	20.8
96	4.5	10.8	26.8	39.8	21.6
97	0	0.7	47.5	55.9	70.1
98	24.7	29.1	51.8	67	54.8
99	0	0	31.1	65.3	33.6
100	0	0	11.5	32.1	36.3
102	0	69.3	24.8	84.7	90
103	0	67.5	61.7	84.4	78.5
105	0	0	35.8	48	35
106	0	0	0	39.9	42