Melissa da Silva Bastos

Polimorfismo antigênico e reconhecimento de regiões
variáveis da proteína 1 de superfície de merozoíto de
Plasmodium vivax (PvMSP-1) por anticorpos
naturalmente adquiridos na Amazônia Ocidental
Brasileira

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Dra. Sandra do Lago Moraes

São Paulo
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bastos, Melissa da Silva

Polimorfismo antigênico e reconhecimento de regiões variáveis da proteína 1 de superfície de merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) por anticorpos naturalmente adquiridos na Amazônia Ocidental Brasileira / Melissa da Silva Bastos. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias .

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias .

Orientadora: Sandra do Lago Moraes .

Descritores: 1.Proteína 1 de superfície de merozoíto 2.Plasmodium vivax
3.Formação de anticorpos 4.Polimorfismo genético 5.Malária

USP/FM/SBD-308/07

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Lourdes e Elson por sempre respeitarem e apoiarem minhas decisões.

Ao Fernando pela paciência e compreensão.

À Dra. Sandra do Lago Moraes pelos ensinamentos transmitidos, pelo envolvimento, pelas trocas de idéias, pela relação de amizade e pelo conforto e incentivo nos momentos difíceis.

Ao Dr. Marcelo Urbano Ferreira por ter possibilitado a minha participação em seu projeto de pesquisa e pela colaboração e participação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Gerhard Wunderlich por ter me recebido tão bem em seu laboratório, pela grande disposição e empenho na produção das proteínas recombinantes.

À Mônica da Silva Nunes, pela competência no desenvolvimento do estudo ao qual meu trabalho está vinculado e pelas imprescindíveis trocas de informações.

À Érika Hoffmann pelas sugestões e auxílio na realização de partes do trabalho.

Aos membros da banca de qualificação Dr. Antonio Walter Ferreira, Dr. Roberto Hiramoto e Dra. Rosely Malafronte pelas sugestões oferecidas.

Às secretárias da MI: Roseli, Rosemeire e Vânia por sempre serem tão atenciosas.

Aos chefes da Otorrinolaringologia Dr. Ricardo Ferreira Bento e Dra. Tanit Ganz Sanchez e à secretária Márcia Alves por diversas vezes terem permitido minha ausência no trabalho para cumprir tarefas relacionadas ao mestrado.

À minha prima e amiga Elisangela pelas demonstrações de interesse e pela torcida.

Ao Dr. Paulo Cotrim e Dra. Hiro Goto por disponibilizarem o uso de seus laboratórios.

À Carmen Arroyo Sanchez, Edite Kanashiro e Sueli Bastos por sempre me socorrerem quando eu precisava de algum material ou orientação.

Aos meus colegas de laboratório, Letusa Albrecht, Uta Goelnitz, Simone Ladeia, Catarina Castineiras, Rogério Lauria, Fabiana Leoratti, Kelly Kanunfre, Sarita Gobbo, Elaine Lemos, Juliana Aoki, Adriano Coelho, Fabrício Petitto, Edna Souza, Maria Prianti, Rosane D'Arcádia, Natalia Tiemi, Camila Juncansen, Luciana Camizotti, Mussya Cisotto, Lílian de Farias, Lilia Targa, pelas trocas de experiência, favores cedidos e bons momentos de convivência.

À Valéria Vilhena e Suely Cardoso, do serviço de Biblioteca e Documentação, pela atenção dispensada nos momentos de finalização do trabalho.

E a todos que possam ter colaborado de maneira indireta.

Não é digno de saborear o mel,
aquele que se afasta da colméia com
medo das picadelas das abelhas

William Shakespeare

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

I- INTRODUÇÃO.....	1
1- A Malária.....	2
1.2- Malária no Brasil.....	4
1.3- O parasito.....	6
1.4- Diagnóstico.....	8
1.5- Profilaxia.....	9
1.6- Resposta imune.....	10
1.7 Proteína 1 de superfície de merozoíto (PvMSP-1).....	14
 II- OBJETIVOS.....	 23
 III- MÉTODOS.....	 26
1- Área de estudo.....	27
2- População.....	30
2.1- Aspectos éticos da pesquisa.....	33
2.2- Processamento das amostras sanguíneas.....	34
3- Produção dos antígenos recombinantes.....	34
3.1- Expressões de regiões polimórficas da PvMSP-1.....	35
3.2- Purificação das proteínas recombinantes.....	39
3.3- SDS-PAGE	40
3.4- <i>Immunoblotting</i>	41
4- Análise do reconhecimento de regiões variáveis da PvMSP-1 por anticorpos de habitantes de área endêmica do Acre.....	42
5- Análise da variação de sequência de PvMSP-1 em isolados do Acre.....	45
6- Análise estatística.....	47

IV- RESULTADOS.....	49
1- Caracterização dos antígenos recombinantes.....	50
2- Seqüenciamento dos blocos variáveis 2, 6 e 10 da região N-terminal da PvMSP-1 dos casos positivos de <i>P. vivax</i> ocorridos durante o seguimento dos indivíduos.....	53
3- Resposta de anticorpos das classes IgG e IgM contra os antígenos recombinantes da MSP-1 de <i>P. vivax</i> no <i>baseline</i>	59
3.1- Correlação dos níveis de anticorpos da classe IgG contra os antígenos recombinantes das regiões variáveis de PvMSP-1 e os respectivos graus de identidade entre as seqüências de aminoácidos...	62
3.2- Análise dos resultados de anticorpos em relação à exposição cumulativa à malária.....	65
4- Resposta de anticorpos das classes IgG e IgM contra os antígenos recombinantes da MSP-1 de <i>P.vivax</i> durante os episódios de malária vivax.....	67
V- DISCUSSÃO.....	78
VI- CONCLUSÕES.....	87
VII- ANEXOS.....	89
VIII- REFERÊNCIAS.....	132

Bastos MS. Polimorfismo antigênico e reconhecimento de regiões variáveis da proteína 1 de superfície de merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) por anticorpos naturalmente adquiridos na Amazônia Ocidental Brasileira (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

A MSP-1 de *Plasmodium vivax* (PvMSP-1), o principal alvo para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária, é constituída por seis domínios altamente polimórficos flanqueados por seqüências conservadas. Apesar de evidências de que a divergência na seqüência da PvMSP-1 está sendo mantida por mais de cinco milhões de anos por seleção balanceada exercida pela imunidade adquirida pelo hospedeiro, a especificidade dos anticorpos adquiridos naturalmente contra a PvMSP-1 ainda é pouco estudada. Este trabalho mostra que 15 proteínas recombinantes que correspondem às variantes da PvMSP-1 comumente encontradas em parasitos locais foram pouco reconhecidas por 376 indivíduos não-infectados com idade entre 5 e 90 anos expostos à malária na Amazônia rural; menos de 30% dos indivíduos tiveram anticorpos IgG detectáveis contra no mínimo uma variante dos blocos 2, 6 e 10 que foram expressas, embora 54,3% reconheceram o domínio conservado C-terminal PvMSP-1₁₉. Apesar da proporção de respondedores às variantes da PvMSP-1 ter aumentado substancialmente durante infecções agudas subseqüentes por *P. vivax*, os anticorpos não foram necessariamente específicos para as variantes da PvMSP-1 encontradas nos parasitos infectantes. São discutidos a contribuição relativa do polimorfismo antigênico, a fraca imunogenicidade e o pecado antigênico original (a tendência de a exposição a uma nova variante antigênica induzir resposta de anticorpos com especificidade pré-existente) para os padrões observados de reconhecimento por anticorpos da PvMSP-1. É sugerido que a resposta de anticorpos ao repertório de domínios variáveis da PvMSP-1 em indivíduos continuamente expostos é induzida somente após algumas infecções repetidas e requerem re-estímulo freqüente, com claras implicações para o desenvolvimento de subunidades de vacinas baseadas na PvMSP-1.

Descritores: 1. Proteína 1 de superfície de merozoíto; 2. *Plasmodium vivax*; 3. Formação de anticorpos; 4. Polimorfismo genético; 5. Malária

Bastos MS. Antigenic polymorphism and recognition of variable domains of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) by naturally acquired antibodies of subjects from Brazilian Western Amazonia (dissertation). Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2007.

The merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* (PvMSP-1), a major target for malaria vaccine development, contains six highly polymorphic domains interspersed with conserved sequences. Although there is evidence that the sequence divergence in PvMSP-1 has been maintained over five million years by balanced selection exerted by host's acquired immunity, the variant-specificity of naturally acquired antibodies to PvMSP-1 remains little investigated. Here we show that 15 recombinant proteins corresponding to PvMSP-1 variants commonly found in local parasites were poorly recognized by 376 noninfected subjects aged 5-90 years exposed to malaria in rural Amazonia; less than onethird of them had detectable IgG antibodies to at least one variant of blocks 2, 6 and 10 that were expressed, although 54.3% recognized the invariant C-terminal domain PvMSP-1₁₉. Although the proportion of responders to PvMSP-1 variants increased substantially during subsequent acute *P. vivax* infections, the specificity of IgG antibodies did not necessarily match the PvMSP-1 variant(s) found in infecting parasites. We discuss the relative contribution of antigenic polymorphism, poor immunogenicity, and original antigenic sin (the skew in the specificity of antibodies elicited by exposure to new antigenic variants due to preexisting variant-specific responses) to the observed patterns of antibody recognition of PvMSP-1. We suggest that antibody responses to the repertoire of variable domains of PvMSP-1 to which subjects are continuously exposed are only elicited after several repeated infections and may require frequent boosting, with clear implications for the development of PvMSP-1-based subunit vaccines.

Descriptors: 1. merozoite surface protein 1; 2. *Plasmodium vivax*; 3. Antibody formation; 4. Genetic polymorphism; 5. Malaria

I- INTRODUÇÃO

1.- A malária

A malária é uma das doenças de maior mortalidade em todo mundo, sendo que cerca de 40% da população mundial vive em regiões de transmissão da doença. É causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, sendo quatro as espécies que infectam o homem: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malarie* e *P. ovale*. Em geral os países endêmicos são os que apresentam menor desenvolvimento e crescimento econômico. As condições climáticas (temperatura, altitude, índice pluviométrico) são importantes para a transmissão, como também a falta de recursos ou a má distribuição destes, a dificuldade de acesso ao tratamento adequado e em tempo hábil, as falhas na adoção de medidas preventivas e os conflitos políticos contribuem para a dificuldade em progredir na luta contra esta doença.

São 107 os países considerados endêmicos, distribuídos em quatro continentes: África, América do Sul e Central, Oceania e partes da Ásia. A África é o de maior endemicidade, fora dessa área a transmissão é menos intensa (World Health Organization -WHO, 2006).

Mais de três bilhões de pessoas vivem sob risco de contrair malária. A cada ano, dentre as cerca de 350–500 milhões de novas infecções, ocorrem mais de um milhão de mortes, sendo a maioria, crianças africanas menores de cinco anos de idade. Epidemias podem ocorrer em populações com pouca ou nenhuma imunidade e podem ser iniciadas por fatores naturais (variações climáticas, desastres naturais) ou por ações humanas que modificam o meio ambiente (abertura de campos para agricultura,

construção de barragens, mineração) e conseqüentemente aumentam a população dos mosquitos capazes de transmitir a malária (Guerra et al., 2006; WHO, 2006).

A grande divergência observada no estabelecimento da malária entre as diferentes regiões do mundo é resultado da variação da dinâmica de transmissão parasito-vetor-homem que favorece ou limita a transmissão e os riscos de doença e morte. Em localidades onde as condições climáticas são favoráveis à transmissão, predomina a espécie mais virulenta, *Plasmodium falciparum*, e também uma das espécies de mosquito mais eficiente na transmissão de malária (*Anopheles gambiae*) (WHO, 2006).

Fora da África, de 80% a 90% das infecções maláricas são ocasionadas por *P. vivax*, com índices de transmissão de baixo a moderado. Estima-se que a cada ano, 70-80 milhões de indivíduos sejam infectados por *P. vivax* em todo o mundo (Mendis et al., 2001), sendo ampla a distribuição geográfica, como nas Américas, Oriente Médio, Ásia Central, do Sul e Sudoeste, Oceania e Leste da África (Figura 1) Mas, apesar de ainda ser um dos principais problemas de saúde nessas regiões, a infecção por *P. vivax* tem vários aspectos fundamentais, de naturezas biológica e epidemiológica, ainda inexplorados.

Figura 1. Distribuição geográfica de *Plasmodium vivax*. Informações sobre fatores que têm importância para a transmissão de malária, como clima, dominância de vetores, altitude e outros foram combinadas para delimitar as áreas de risco. Fonte: Guerra et al., 2006

1.2- Malária no Brasil

No Brasil, a transmissão da malária restringe-se essencialmente à Amazônia, onde se encontram mais de 98% dos casos registrados no país. Entre 1970 e meados da década de 90, a incidência anual de malária no Brasil multiplicou-se por dez, estabilizando-se em torno de 500.000 casos anuais. Em 1999, entretanto, observou-se novo aumento expressivo de incidência, chegando ao recorde histórico de 637.000 casos notificados, totalizando mais de 50% de todos os casos registrados na região das Américas (Fundação Nacional da Saúde - FUNASA, 2006). Nos anos seguintes, como resultado da elaboração do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), obtiveram-se reduções significativas (em torno de 50%) no número de casos registrados em 2002. Este plano baseou-se essencialmente no diagnóstico e tratamento precoces das infecções humanas, com os objetivos de diminuir a morbidade e evitar que

os indivíduos infectados se tornassem fonte de infecção para os vetores locais. Porém, a partir de 2002, houve um aumento na incidência de malária nessa região, com registro de mais de 410.000 casos em 2004. Atualmente, o Ministério da Saúde mantém o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) para tentar manter os níveis observados em 2002 (Ministério da Saúde, 2006).

Até meados da década de 80, as infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* eram igualmente prevalentes na Amazônia brasileira, mas a partir deste período, a prevalência de *P. vivax* foi crescente, chegando a aproximadamente 80% dos casos notificados em 2003 (FUNASA, 2006). A emergência de resistência à cloroquina, a principal droga contra *P. vivax*, é uma das principais preocupações das estratégias atuais de controle da malária *vivax*. Apesar de os casos de resistência serem mais comuns na Indonésia, alterações nas doses mínimas e utilização de diferentes drogas estão sendo testados como forma alternativa de tratamento global (Baird, 2004).

A recorrência de parasitemia pode ser originada por reinfeção, recidiva (ativação de hipnozoítos) ou recrudescência, que é favorecida por resistência à cloroquina. Porém, os métodos de análise genética não permitem distinguir e identificar a origem da recorrência; em recaídas a população de parasitos obtida durante o ataque primário é idêntica àquela que surge posteriormente. (Kirchgatter e del Portillo, 1998) ou quando os parasitos são geneticamente distintos, pode ser por ativação de uma minoria

de hipnozoítos com genótipo não detectado inicialmente ou pode ser reinfecção.

1.3- O parasito

O *Plasmodium* é um protozoário do filo Apicomplexa, se desenvolve e é transmitido por um complexo ciclo de vida que envolve um hospedeiro vertebrado (humano ou outro), onde ocorrem duas fases assexuadas do ciclo (esquizogonia hepatocítica e eritrocítica) e um vetor invertebrado (mosquitos do gênero *Anopheles*), onde ocorrem uma fase sexuada do ciclo (esporogonia).

O ciclo de vida do parasito se inicia a partir da entrada de esporozoítos na corrente sangüínea do hospedeiro. Ao alcançar o fígado, o estágio pré-eritrocítico ou exoeritrocítico do ciclo é iniciado. No hepatócito, o esporozoíto perde seu complexo apical iniciando o processo de diferenciação, crescimento e multiplicação do parasito por sucessivas divisões mitóticas (Perlmann e Troye-Blomberg, 2002). Subseqüentemente, surge então o esquizonte, cujo citoplasma ao final da esquizogonia, contém milhões de núcleos, que dão origem aos merozoítos. Após o rompimento da célula hepática, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, é iniciada então a fase eritrocítica do ciclo (Rey, 2002). No ciclo de vida do *P. vivax* algumas formas podem ficar latentes no fígado, e são chamadas de hipnozoítos, estes podem ser ativados posteriormente e voltar ao ciclo hepático causando recidivas da doença.

O merozoíto se liga ao eritrócito por moléculas de adesão da membrana de superfície e do complexo apical. As proteínas envolvidas no processo são características dessa forma parasitária, como a proteína 1 de superfície de merozoíto (MSP-1), que se liga de forma específica à superfície do eritrócito. O merozoíto ao entrar no eritrócito libera a membrana de superfície no meio extracelular e seus complexos de membranas internas e microtúbulos subpeliculares são degradados, ele se torna então um trofozoíto, cujo processo de desenvolvimento resulta na formação de novo esquizonte, que ao romper a membrana do eritrócito libera novamente milhares de merozoítos na circulação, cada um em busca de novo eritrócito para nova invasão e continuidade do ciclo eritrocítico (Cimerman e Cimerman, 1999).

Alguns merozoítos, após a invasão da hemácia, interrompem o ciclo eritrocítico ao darem origem às formas de reprodução sexuada do parasito, os gametócitos. Estes permanecem dentro das hemácias circulantes.

O mosquito fêmea do *Anopheles*, ao realizar o repasto sanguíneo, pode ingerir gametócitos contidos no interior das hemácias, que se diferenciam em gametas masculinos e femininos. A fusão dos gametas ocorre no estômago do mosquito e resulta na formação do ovo ou zigoto, que após se transformar em oocineto, se dirige em direção ao epitélio da parede intestinal, e se aloja entre o epitélio e a membrana basal, originando o oocisto, forma encapsulada.

No interior do oocisto, ocorre uma divisão meiótica seguida de várias divisões mitóticas, resultando na formação de milhares de esporozoítos que

migram para as glândulas salivares dos mosquitos; durante os próximos repastos sangüíneos eles são injetados no hospedeiro vertebrado.

1.4- Diagnóstico

A malária pode ser diagnosticada por exame clínico. A apresentação de um quadro com sinais e sintomas característicos da doença somada ao risco de exposição ao parasito pode indicar que a pessoa está infectada. Este método diagnóstico é falho nos casos em que os sintomas são menos marcados ou estão totalmente ausentes (pacientes assintomáticos). O diagnóstico clínico deve ser complementado por exames laboratoriais e por dados epidemiológicos.

O diagnóstico laboratorial de malária é mais comumente realizado pelo teste da gota espessa, que consiste na preparação de uma lâmina com uma gota do sangue do indivíduo a ser testado, obtido geralmente por punção digital. Após secagem e coloração da lâmina, o material é observado em microscópio. Este teste é bastante informativo, pois em casos de infecção, é possível identificar a espécie infectante. Pode-se observar também diferentes formas do parasito e até mesmo alterações provocadas por drogas. É um método quantitativo, porém pode perder a sensibilidade em casos com baixas parasitemias.

Outra forma de se diagnosticar malária patente é pela detecção de antígenos do parasito presentes no soro do paciente. Vários testes rápidos para a detecção de antígenos plasmodiais foram desenvolvidos nos últimos

anos, como o Parasight®, Optimal®, etc. Esses métodos apresentam vantagens como facilidade de execução, leitura e rapidez, mas ainda são caros e com sensibilidade inferior à gota espessa.

A perspectiva do emprego de métodos moleculares no diagnóstico de malária também tem sido bastante explorada. A reação da cadeia da polimerase (PCR) é bastante eficiente tanto na detecção do parasito, como na identificação da espécie. Os testes moleculares apesar de serem bastante sensíveis e específicos, não são usados rotineiramente por serem altamente dispendiosos, mas atualmente, têm sido largamente empregados em pesquisas científicas.

1.5- Profilaxia

Uma maneira de evitar a malária é impedir o contato do mosquito vetor com o humano, algumas medidas são adotadas neste sentido, como utilização de redes protetoras (mosquiteiros) tratadas com inseticidas, loções repelentes, entre outras, porém a melhor medida preventiva seria a imunização das populações de área endêmica com uma vacina eficiente contra o parasito, alguns antígenos como DBP, AMA1, RESA, MSP-2, CSP e MSP-1 são objetos de estudo que tem como finalidade o desenvolvimento de vacina, porém uma das dificuldades encontradas é a natureza polimórfica dos antígenos candidatos.

1.6- Resposta imune

Em áreas de alta transmissão de malária, a aquisição de anticorpos é dependente principalmente do tempo de exposição ao parasito. Crianças de até aproximadamente seis meses de idade têm menor risco de desenvolver a doença, pois anticorpos recebidos passivamente da mãe durante a gestação são capazes de prevenir a manifestação de sintomas, porém quando esses anticorpos são perdidos a criança passa a ser um dos mais frágeis alvos da malária em virtude de seu sistema imune não ser suficientemente desenvolvido.

A partir dos cinco anos de idade os indivíduos iniciam o desenvolvimento gradual de imunidade, que apesar de não impedir o estabelecimento de novas infecções, confere redução no número de parasitos infectantes, diminuição da intensidade dos sintomas clínicos e redução de mortalidade.

Em áreas de transmissão instável de malária a imunidade é menor mesmo em adultos, pois nestas regiões os intervalos entre infecções são grandes, de um ano ou mais. Nestas condições a aquisição de imunidade é lenta e pode ser perdida ou até mesmo não se desenvolver, tornando as infecções altamente debilitantes.

Um dos principais obstáculos para a aquisição de imunidade antimalárica efetiva é o polimorfismo de antígenos imunodominantes, que permite ao parasito escapar da resposta imune induzida por formas variantes dos mesmos antígenos (Ferreira et al., 2004). A infecção com uma

variante antigênica não reconhecida pelo repertório de anticorpos já existente pode progredir para a multiplicação descontrolada do parasito e subsequente aparecimento de sintomas (Carter e Mendis, 2002).

A complexidade do ciclo de vida do *Plasmodium*, em que diferentes antígenos de superfície são expressos nos diferentes estágios do ciclo, induz a produção de anticorpos estágio-específicos, especialmente da classe IgG. As formas mais imunogênicas são as encontradas no estágio sangüíneo, por estarem mais expostas ao sistema imune.

A imunidade de estágio sanguíneo envolve a participação principalmente de anticorpos que exercem várias funções efetoras antiparasitárias incluindo inibição de citoaderência, inibição da invasão do eritrócito e inibição de toxicidade. Estudos que realizaram transferência passiva de anticorpos monoclonais contra antígenos de *Plasmodium* conferiram proteção em camundongos (Valero et al., 1998). Pacientes infectados com *P. falciparum* e tratados com anticorpos IgG purificados do soro de adultos africanos imunes tiveram redução na carga parasitária e sintomas clínicos. Outra demonstração da importância de anticorpos no controle da infecção é o fato de camundongos sem a linhagem de linfócitos B serem incapazes de diminuir a parasitemia, entrando num estado de parasitemia crônica, além disso, esses animais quando tratados com drogas antimaláricas apresentam parasitemia aguda numa segunda infecção ou quando recebem linfócitos B de doadores imunes recuperam a capacidade de realizar o clareamento parasitário (Wipasa et al., 2002).

A opsonização e a inibição celular dependente de imunoglobulinas são mediadas por anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3. Essas subclasses são associadas à menor parasitemia e redução do risco de patologia na malária. Anticorpos da subclasse IgG2 também têm sido associados à proteção, já os anticorpos IgG4 ocorrem em maiores níveis em indivíduos suscetíveis e que apresentam formas clínicas mais graves da doença. Sugere-se que seja pelo fato de este subtipo competir com anticorpos citofílicos por antígenos do parasito (Wipasa et al., 2002).

Os mecanismos efetores de imunidade celular também são importantes e envolvem mecanismos de ativação de macrófago por célula *natural killer* (NK), ativação de célula T CD4+ com produção de interferon γ (IFN- γ), inibição do crescimento e desenvolvimento do parasito dentro do hepatócito por células T CD8+ citotóxicas (Plebanski e Hill, 2000; Artavanis-Tsakonas et al. 2003).

A infecção experimental por plasmódios de camundongos com células T CD4+ “inativadas” resulta na perda da capacidade de controlar o crescimento do parasito, o que sugere que as células T CD4+ são importantes no controle da infecção.

A ativação das diferentes células T CD4+ (Th1 e Th2) é essencial para a imunidade protetora. O balanço entre esses dois subtipos determina o desfecho da doença. Em infecção experimental de camundongos por *P. chabaudi*, as células Th1 e Th2 têm atividades em diferentes estágios da infecção, células Th1 desempenham um papel importante no início, com produção de citocinas que contribuem para o clareamento inicial da

parasitemia. (Wipasa et al., 2002). No decorrer da infecção as células Th1 dão lugar às células Th2 que iniciam atividades ligadas à produção de anticorpos específicos (Fell e Smith, 1998).

Em geral, agentes infecciosos induzem a produção de interleucina-12, que na malária assume um papel importante ao induzir a ativação de células NK e T CD4+ produtoras de IFN- γ , que por sua vez induz atividade fagocítica. A ausência de IFN- γ dificulta a proliferação local de macrófagos e em camundongos resulta em maior mortalidade. Células mononucleares de indivíduos adultos e de crianças infectadas com *P. falciparum* secretam IFN- γ após estimulação com antígenos de merozoíto. O grau de proliferação dessas células se correlaciona com o número de malárias prévias. Em relação aos níveis de IFN- γ , crianças com altos níveis desta citocina têm menor risco de reinfecção, ao contrário, crianças com malária grave apresentam menores níveis de IFN- γ e são mais suscetíveis à reinfecção.

Interferon- γ está envolvida na produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que pode ter um papel protetor ou patológico dependendo dos níveis, tempo e localização da secreção, secreção de TNF- α no cérebro está relacionada à apresentação de malária cerebral. A presença de IFN- γ e TNF- α induz a síntese de óxido nítrico (NO), que possivelmente está envolvido na regulação da resposta imune à malária e não diretamente na eliminação do parasito (Riley, 2006).

Dentre os vários antígenos imunogênicos expressos na fase eritrocítica, a proteína 1 da superfície de merozoíto (MSP-1) é uma das mais estudadas atualmente.

1.7- Proteína 1 da superfície de merozoíto (MSP-1)

A proteína MSP-1 é expressa abundantemente na superfície de merozoítos de todas as espécies de *Plasmodium*. É uma glicoproteína cuja massa molecular varia de 180 KDa a 230 KDa e é fixada na membrana do parasito por uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). É sintetizada durante a esquizogonia e até o momento da invasão de eritrócitos sofre processamento por clivagem proteolítica que resulta em fragmentos menores (Holder e Freeman, 1982).

Os fragmentos resultantes do processo proteolítico têm massa molecular aproximada de 83, 30, 38 e 42 KDa, sendo que o último sofre um segundo processamento de clivagem e resulta em dois novos fragmentos, um de 33 KDa e outro de 19 KDa. A função biológica da MSP-1 é pouco esclarecida, porém, o fragmento C-terminal de 19 KDa que é mantido na superfície do merozoíto (MSP-1₁₉) após o processamento proteolítico (Blackman et al., 1990), possui dois domínios EGF-like (fator de crescimento epidérmico) e estes domínios estão envolvidos na interação merozoíto-eritrócito (Blackman et al., 1991; Blackman et al., 1994).

Alguns trabalhos (Blackman et al., 1990; Han et al., 2004; O'Donnell et al., 2001) mostram que a interação merozoíto-eritrócito pode ser bloqueada *in vitro* por anticorpos adquiridos naturalmente de indivíduos expostos em área endêmica. Roedores e primatas se tornam parcialmente protegidos quando recebem doses de MSP-1₁₉ recombinante espécie-específica

(Valero et al., 1998; Yang et al., 1999) e anticorpos mono e policlonais produzidos contra este fragmento respondem satisfatoriamente em estudos imunológicos (Valero et al., 1998; Sachdeva et al., 2004).

A comparação estrutural da MSP-1 entre diferentes espécies de *Plasmodium* revela que esta proteína possui regiões conservadas, semi-conservadas e variáveis. As regiões conservadas possuem pouca mutação pontual e, portanto, pouca modificação de aminoácidos, sugerindo que esta parte da molécula tem importantes propriedades funcionais ou estruturais (del Portillo et al., 1991; Premawansa et al., 1993).

A sequência do gene da MSP-1 de *Plasmodium falciparum* (PfMSP-1) é dividida em 17 blocos (sete altamente variáveis, cinco conservados e cinco semi-conservados) (Figura 2). Nos blocos variáveis, os padrões alélicos são bem caracterizados, distinguindo duas versões alternativas, compondo um modelo dimórfico (Tanabe et al., 1987). A MSP-1₁₉ corresponde aproximadamente ao bloco conservado 17.

Figura 2. Representação esquemática da PfMSP-1. Blocos conservados, semiconservados e variáveis são apresentados por branco, preto e listras respectivamente. Fonte: Ferreira et al., 2003.

As duas famílias alélicas que compõem o dimorfismo encontrado nos blocos variáveis da PfMSP-1 são chamadas de K1 e MAD20, porém existe uma exceção no bloco 2, uma terceira família alélica chamada RO33 pode

ser encontrada nesse bloco, que se caracteriza por ser altamente repetitivo (Cooper, 1993).

A comparação da sequência da PvMSP-1 (isolado Belém) com as seqüências da MSP-1 de *P. falciparum* e *P. yoelii* permitiu determinar as regiões com maior identidade entre os aminoácidos. Foram identificadas sete regiões conservadas entre as três espécies, que foram chamadas de blocos conservados interespecies (ICBs: 1, 2, 4, 5, 6, 8 e 10) e três regiões conservadas apenas entre *P. vivax* e *P. falciparum*, chamadas de blocos conservados (CBs: 3, 7 e 9) (del Portillo et al., 1991). Na região C-terminal da PvMSP-1 correspondente à PvMSP-1₁₉ (inserida no chamado ICB 10) foram encontrados dez resíduos de cisteína em posições similares aos encontrados em *P. falciparum* e *P. yoelii*. Os resíduos de cisteína estão configurados como dois domínios EGF-like, relacionados à invasão do eritrócito pelo merozoíto (Han et al., 2004).

Uma segunda classificação referente aos blocos que compõem a PvMSP-1 foi feita por Putaporntip (2002) após a análise da estrutura da MSP-1 de diferentes isolados de *Plasmodium vivax*. Nessa classificação, a proteína é composta por sete blocos conservados (blocos 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13) e seis blocos variáveis (blocos 2, 4, 6, 8, 10 e 12), quatro deles repetitivos. A figura 3 representa as duas classificações dos blocos que compõem a PvMSP-1 e relaciona as respectivas nomenclaturas.

Figura 3- Representação esquemática da proteína 1 de superfície de merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) e os antígenos recombinantes utilizados no estudo. **A:** as seqüências que codificam a PvMSP-1 compreendem sete blocos conservados (similaridade de aminoácidos entre os alelos da PvMSP-1: 71-85%, representados por blocos de cor branca) e seis blocos variáveis (similaridade de aminoácidos: 21-34%, representados por blocos de cor preta) descritos por Putaporntip et al., 2002. **B:** divisão original da PvMSP-1 em blocos conservados interespecíes (ICBs) (similaridade de aminoácido >48% entre a MSP-1 de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. yoelii*, representados por blocos brancos), blocos conservados (CBs) (similaridade de aminoácidos >50%entre *P. falciparum* e *P. vivax*, representados por blocos listrados) e blocos polimórficos (similaridade de aminoácidos <45%, representados por blocos de cor preta)

C: localização dos 16 antígenos utilizados neste estudo. Note que os antígenos que correspondem aos domínios variáveis da PvMSP-1 possuem trechos de seqüências conservadas flanqueadoras. O antígeno do bloco 13 corresponde ao ICB10 , o fragmento C-terminal de 19 KDa da PvMSP-1.

Só é possível verificar padrão dimórfico (Belém e Salvador I), na região variável onde está localizado o bloco 6, que no alelo Belém contém um motivo repetitivo de resíduos de glutamina e no alelo Salvador I exibe uma variação não repetitiva na seqüência (del Portillo et al., 1991; Gibson et al., 1992; Putaporntip et al., 2002). Recombinação entre esses dois tipos alélicos são freqüentes e resultam no aparecimento de novas versões antigênicas (Putaporntip et al., 1997). Grande parte das variantes encontradas na Amazônia brasileira constitui-se de mosaicos de seqüências derivadas dos tipos Belém e Salvador I (figura 4) (Putaporntip et al., 2002).

Figura 4- Variação alélica da PvMSP-1 representada por associações de seqüências de seis blocos variáveis. Os blocos 2, 6, 8 e 10 contêm domínios repetitivos. São apresentados os números de repetições em *tandem*. Cada tipo de seqüência é indicada por padrões branco, preto, listras e xadrez (um dado padrão não representa a mesma seqüência em blocos diferentes). Cada linha representa um tipo alélico, A: Belém; B: Salvador I; C: BP29; D:BP1; E: BP13; F: BP30; G:BR7; H: BP39. Fonte: adaptada de Putaporntip et al., 2002

Ao contrário do que ocorre com a PfMSP-1, cujos locais de recombinação são restritos às porções terminais 5' e 3', os locais de

recombinação do gene da PvMSP-1 estão espalhados ao longo de toda sua extensão (Putaporntip et al., 2002). Somando a isso o fato de uma porção significativa das infecções por *P. vivax* serem mistas e haver a ocorrência de recaídas, das quais os isolados podem não ser clonais (Kirchgatter e del Portillo, 1998), pode-se explicar o alto índice de recombinação entre alelos heterozigotos do gene da PvMSP-1 durante a meiose no mosquito vetor, mesmo em áreas de baixa transmissão.

A grande divergência de seqüências nos domínios variáveis da PvMSP-1 (similaridade de aminoácidos de 21-34%) tem sido mantida por seleção balanceada há mais de cinco milhões de anos, provavelmente como resultado de pressão imune variante-específica (Putaporntip, 2006). A estrutura polimórfica da MSP-1 é usada como marcador epidemiológico (Leclerc et al., 2005) por possibilitar a distinção entre diferentes populações de parasitos, o que é imprescindível para o entendimento da epidemiologia local e global da espécie. A estrutura populacional de um parasito normalmente apresenta importantes variações geográficas, sendo que a distribuição das diferentes cepas pode determinar o proveito da formulação de uma droga ou vacina em uma dada região endêmica.

O estudo de genes específicos que codificam antígenos de vacina fornece informação sobre como diferentes alelos são gerados e mantidos na população e delineia a importância de fatores como recombinação intragênica e seleção natural dos polimorfismos, podendo responder questões fundamentais relacionadas à associação de alelos específicos com

resistência à droga e como a variação genética afeta o desenvolvimento e emprego de uma vacina (Cui et al., 2003).

A resposta de anticorpos IgG, apresenta padrões distintos para as porções C-terminal e N-terminal da PvMSP-1. Se comparadas, a região C-terminal é mais imunogênica em infecções naturais (Soares et al., 1999a), sendo que a prevalência de anticorpos contra esta região é maior, mas anticorpos contra a região N-terminal também são presentes.

A porção C-terminal (que contém a PvMSP-1₁₉), apesar de altamente conservada entre diferentes isolados, com apenas algumas variações de aminoácidos, é bastante imunogênica (Soares et al., 1999b). Anticorpos da classe IgG contra a PvMSP-1₁₉ (bloco 13) são detectáveis desde a primeira infecção, porém os títulos se elevam durante períodos patentes de infecções subseqüentes. No intervalo entre infecções os títulos desses anticorpos são mais baixos. Anticorpos da classe IgM contra a região C-terminal são encontrados em níveis elevados na primeira infecção e em níveis reduzidos nas infecções subseqüentes (Soares et al., 1999c).

Respostas de anticorpos contra blocos polimórficos da região N-terminal da PvMSP-1 têm sido descritas em infecções naturais, sendo que a imunidade é variante-específica (Levitus et al., 1994). A resposta de anticorpos IgG contra as regiões variáveis foi descrita como sendo mais intensa na primeira infecção e reduzida nas infecções subseqüentes (Soares et al., 1997; Soares et al., 1999c). Porém Nogueira e colaboradores (2006) descrevem o oposto, anticorpos contra a região N-terminal são mais freqüentes em indivíduos mais velhos e com tempo de residência em área

endêmica acima de quinze anos e também observaram a associação de anticorpos adquiridos naturalmente contra a proteína recombinante (ICB2-5) que compreende os blocos variáveis 2 e 4 da PvMSP-1 com proteção contra doença clínica no Brasil, mas ainda não se sabe se os anticorpos protetores são variante-específicos, pois somente uma versão destes domínios foi usada como antígeno nos ensaios sorológicos e as variantes da PvMSP-1 não foram caracterizadas nas infecções incidentes.

Um estudo realizado na Colômbia há aproximadamente dez anos (Mancilla et al., 1994), mostrou que pacientes com malária vivax tinham anticorpos que discriminavam entre antígenos recombinantes que representavam duas versões altamente divergentes do bloco 6, mas não foi feita nenhuma associação entre a resposta de anticorpos e imunidade clínica.

O perfil de resposta IgM contra as regiões variáveis não é claro, em um estudo longitudinal, indivíduos com mais de seis malárias desenvolveram apenas resposta de anticorpos IgM, sem que houvesse a conversão em anticorpos da classe IgG (Mertens et al., 1993).

A PvMSP-1 é uma forte candidata à vacina contra o estágio assexuado sanguíneo de *Plasmodium vivax* por estar diretamente exposta ao sistema imune do hospedeiro. Entretanto o alto polimorfismo dessa proteína deve induzir resposta de anticorpos variante-específicos, o que pode limitar o seu potencial como vacina.

Neste trabalho, foi proposta a realização de uma importante investigação do quanto a diversidade de seqüências da PvMSP-1

II- OBJETIVOS

Objetivo geral: Investigar o efeito da diversidade antigênica da MSP-1 de isolados naturais de *Plasmodium vivax* da Amazônia brasileira no reconhecimento por anticorpos de indivíduos naturalmente expostos à malária

Objetivos específicos:

1- Investigar o reconhecimento imune humoral de regiões variáveis e da região conservada C-terminal da proteína 1 de superfície de merozoíto (MSP-1) de *Plasmodium vivax* por indivíduos naturalmente expostos à malária

Etapas

a. Expressar e purificar antígenos recombinantes correspondentes às variantes alélicas (blocos 2, 6 e 10) e da região conservada C-terminal da PvMSP-1 (bloco 13)

b. Analisar a resposta de anticorpos IgG e IgM naturalmente adquiridos contra os antígenos recombinantes por teste imunoenzimático de indivíduos expostos à malária não infectados no *baseline* e durante episódios clínicos de malária vivax ocorrentes durante o seguimento por 15 meses

2- Analisar os padrões de diversidade de sequência de genes de blocos variáveis da PvMSP-1 de parasitos locais

Etapas

- a. Seqüenciar as regiões dos blocos variáveis 2, 6 e 10 da PvMSP-1 das amostras de sangue colhidas durante os episódios clínicos de malária ocorridos durante o seguimento de 15 meses na região amazônica brasileira (Acrelândia)
 - b. Seqüenciar as regiões dos blocos variáveis 2, 6 e 10 da PvMSP-1 das amostras de sangue colhidas em 1999 na região para identificar as variantes que ocorriam antes do início de estudo
- 3- Analisar a resposta imune humoral aos antígenos variáveis em função das seqüências da PvMSP-1 encontradas no local.

III- MÉTODOS

1-. Área de estudo

Acrelândia é um município situado no extremo oriental do estado do Acre e foi criado em 1993. Situa-se à 102 Km de Rio Branco, a capital do estado e faz fronteira com os municípios acreanos de Plácido de Castro e Senador Guiomard, com os estados de Rondônia e Amazonas e com a Bolívia. É o único município acreano de alto risco para malária, segundo o critério adotado pelo Ministério da Saúde (incidência parasitária anual acima de 50 casos por 1.000 habitantes). Com menos de 2% da população do estado, Acrelândia contribui com quase 20% dos casos de malária notificados no Acre; sendo que a área rural, com cerca de 4.000 habitantes, registra mais de 80% dos casos de malária do município. O índice de desenvolvimento humano (IDH) é de 0,680 (Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira - INEP, 2004), com uma taxa de mortalidade infantil de 70,75 por 1.000 nascidos vivos (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE 1998, dados não-publicados). A taxa de analfabetismo é de 26,7%, chegando a 31,9% na zona rural (INEP, 2004), onde vivem 57% dos habitantes do município.

Segundo a Secretaria Estadual de Saúde do Acre (SESACRE) o município de Acrelândia (figura 5) é dividido em 92 microáreas de notificação de casos de doenças transmissíveis. Tanto em 2001 como em 2002, a gleba Q da Linha 14 (Ramal do Granada) foi a microárea com maior número de notificações de casos de malária (192 em 2001 e 75 em 2002). A linha 14 também é a microárea com maior número de habitantes (415 habitantes

cadastrados em 2002 pela Coordenação local de controle de endemias). Essa linha foi aberta na década de 70, quando do início do projeto de assentamento dirigido (PAD) Pedro Peixoto realizado pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA).

No Ramal do Granada existem um posto de saúde municipal e três postos de diagnóstico de malária, o maior deles conta com auxiliares de enfermagem treinados para a atenção primária à saúde, além disso, há uma equipe de campo volante composta por um inspetor e quatro agentes que percorrem diariamente a área realizando busca ativa de casos de malária. Todos os atendimentos são registrados nos diários da equipe de saúde, facilitando a identificação dos indivíduos com malária e outras patologias. Os microscopistas participam de um programa contínuo de controle de qualidade do diagnóstico microscópico.

A transmissão de malária é heterogeneamente distribuída pelo Ramal do Granada em decorrência dos diferentes padrões de uso da terra e derrubada da floresta. Em função dessas diferenças, a área de estudo foi dividida em quatro setores relativamente homogêneos com incidência crescente de malária, setor A (do Km 14 ao Km 20 do Ramal) com 0,46 episódios de malária vivax/100 pessoas-mês, setor B (Km 20 – Km24) com 0,79 casos/100 pessoas-mês, setor C (Km 24 – Km 30) com 3,44 casos/100 pessoas-mês e setor D (Reserva da Liha 14), setor de maior incidência de malária, com 9,71 casos/100 pessoas-mês (figura 5). Estes são índices de incidência medidos entre março de 2004 e maio de 2005.

Figura 5. Estado do Acre, mostrando os municípios de Acrelândia e Plácido de Castro (locais de origem das amostras colhidas em 1999) e área atual do estudo (Ramal do Granada). Acrelândia e Plácido de Castro são separados por 35 Km de distância. O Ramal do Granada, localizado a 30–50 Km de Acrelândia, faz parte do assentamento agrícola Pedro Peixoto (em cinza). Círculos ao longo do Ramal do Granada representam domicílios. Região de alto risco para *P. falciparum*: círculos pretos. Região de risco para malária em geral: círculos preto e cinza escuro. Região de risco para *P. vivax*: círculos preto, cinza escuro e cinza claro. Quadrados: domicílios cujos residentes não participaram do estudo até o final.

Em virtude das características epidemiológicas, da facilidade de acesso e da presença dos postos de diagnóstico de malária bem como do posto de saúde municipal, a gleba Q da linha 14 (km 14 a 30 do Ramal do Granada) foi a área escolhida para a realização do estudo. Além dessa área, incluiu-se também a Reserva da Linha 14, por ser área contígua com a gleba Q da linha 14 e por apresentar grande número de casos de malária (50 casos em 2002 para uma população de 50 habitantes).

2- População

Realizou-se um censo domiciliar em que todas as edificações (habitadas ou não) situadas na área de estudo foram localizadas (com auxílio de plantas fornecidas pelas equipes locais da Coordenação de Controle de Endemias da SESACRE) e visitadas pela equipe de campo (dois médicos, um biólogo e um auxiliar de pesquisa). Os objetivos do projeto de pesquisa foram expostos a cada família, para obtenção de consentimento informado por escrito. Realizou-se também: (a) aplicação de um amplo questionário para obtenção de dados demográficos, sócio-econômicos e de morbidade pregressa, bem como uma descrição detalhada dos domicílios, (b) exame clínico de todos os habitantes do domicílio por um médico da equipe de campo, (c) colheita de amostra sangüínea venosa de todos os habitantes do domicílio com idade igual ou superior a cinco anos e (d) determinação da localização exata do domicílio com um equipamento portátil

de navegação eTrex® (Garmin International, Olathe, EUA), com precisão de 15 metros.

O censo domiciliar identificou 509 habitantes (264 do sexo masculino e 245 do sexo feminino), com idade variando entre um dia e 90 anos, distribuídos em 123 domicílios. Do total de habitantes, 399 tinham mais de cinco anos de idade e não apresentavam indícios de infecção por *P. vivax* (condições para que fossem considerados elegíveis para participação no estudo sorológico), destes, 376 formaram o *baseline* para o estudo sorológico.

Indivíduos que apresentaram malária incidente durante o estudo longitudinal desenvolvido na área, entre março de 2004 e maio de 2005, tiveram sangue venoso colhido, sempre que o paciente concordou.

Quatro grupos de amostras biológicas foram empregados para o presente estudo:

GRUPO 1: 27 amostras de sangue positivas para *P. vivax*, colhidas em 1999, de indivíduos residentes nos municípios de Plácido de Castro (n=19) e Acrelândia (n=08), com idades de 3 a 51 anos.

GRUPO 2: 376 amostras de soro de indivíduos com idades variando de cinco a 90 anos, residentes em Acrelândia, colhidas em Março/Abril de 2004 (*baseline*).

GRUPO 3: 70 amostras de sangue colhidas de pacientes com malária por *P. vivax* incidente durante o estudo longitudinal desenvolvido na área rural de Acrelândia, entre março de 2004 e maio de 2005.

Grupo 4: 54 amostras de soro de indivíduos com malária vivax incidente durante o estudo longitudinal.

"Pool" de 90 soros positivos para malária (de indivíduos residentes em Rondônia) da soroteca do ICB-USP e 21 soros de doadores de sangue do HEMOCENTRO de São Paulo, SP, área não endêmica de malária, foram usados como controles positivo e negativo nos ensaios de ELISA, respectivamente. Todas as amostras foram conservadas a -20° C.

Na tabela 1 apresentamos os dados demográficos (idade, sexo) e dados de exposição à malária: idade no início de exposição, tempo de residência na área endêmica, relato de malária recente, considerando como recente, episódios de malária vivax confirmados por lâminas positivas nos três postos locais de diagnóstico durante o período de janeiro de 2001 e março de 2004 e número de malárias anteriores da população estudada (n= 376).

Tabela 1 - Características demográficas e de exposição à malária dos 376 indivíduos incluídos no estudo da resposta de anticorpos residentes em Acrelândia, AC, área endêmica de malária

VARIÁVEL		N
Idade (mediana)		24 anos
Sexo	Homens	197
	mulheres	179
Idade de início de exposição à malária	(mediana)	4 anos
Tempo de residência na Amazônia	(mediana)	14 anos
Malária recente	Sim	133 (35,4%)
	Não	243 (64,6%)

2.1- Aspectos éticos da pesquisa

As amostras de sangue do grupo 1 tratam-se de amostras estocadas no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB/USP). Foram mantidos todos os cuidados necessários em relação aos aspectos éticos da conservação e utilização de material biológico estocado, ou seja, foi garantida a preservação rigorosa do anonimato dos indivíduos originariamente envolvidos.

As amostras de sangue e soro dos grupos 2, 3 e 4 foram colhidas pela Dra. Mônica da Silva Nunes, aluna de doutorado do Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira, para realização do projeto “*Plasmodium vivax*: estrutura populacional, dinâmica de transmissão e aquisição de imunidade em uma comunidade rural da Amazônia brasileira” (Anexo I), aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos – ICB/USP (Anexo II). Este trabalho também recebeu aprovação das seguintes comissões: Comissão de ética em Pesquisa do IMT-SP (Anexo III), CAPPesq-HCFMUSP (Anexo IV), CIBio (anexo V). Todos os indivíduos incluídos no estudo foram informados sobre os aspectos científicos da pesquisa de forma clara e em termos simples e da necessidade de se colher sangue por punção venosa. Também foi assegurado que se algum indivíduo se recusasse a participar do estudo, não seria discriminado ou punido por parte da Instituição de Saúde. As amostras de sangue foram colhidas somente após o consentimento livre e esclarecido por escrito (Anexo VI).

2.2- Processamento das amostras sanguíneas

As amostras de soro e sangue total foram colhidas em tubos estéreis do tipo *Vacutainer* seco e com EDTA respectivamente, e processadas em Acrelândia.

As lâminas com gota espessa foram preparadas segundo procedimento padrão (Trape, 1985) e examinadas pelos microscopistas do Ramal do Granada. Posteriormente as lâminas foram enviadas para revisão pelo Sr. Francisco das Chagas, consultor da OMS em Brasília.

As alíquotas de papa de hemácia foram submetidas à extração de DNA utilizando-se kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, IL, USA) ou método do fenol-clorofórmio.

As amostras de DNA foram testadas para a presença de DNA de plasmódios humanos e determinação da espécie através de reação em cadeia da polimerase (PCR) aninhada, desenvolvida por Kimura et al (1997) e modificada por Win et al (2002).

3- Produção dos antígenos recombinantes

No estudo sorológico foram empregados antígenos recombinantes derivados de regiões polimórficas da PvMSP-1, expressos durante o desenvolvimento deste trabalho e um antígeno recombinante derivado da

região C-terminal de 19 kDa da molécula (PvMSP-1₁₉), cujo fragmento foi gentilmente cedido pelo Dr. Gerhard Wunderlich (Dept. de Parasitologia ICB/USP), motivo pelo qual sua produção não será detalhada abaixo.

3.1- Expressão de regiões polimórficas da PvMSP-1

A expressão de proteínas recombinantes em fusão com glutathione-S-transferase (GST) de variantes da PvMSP-1 encontradas na Amazônia brasileira foi realizada a partir de DNA genômico extraído de seis isolados de *P. vivax* colhidos em Rondônia em 1995 e 1997 (denominados: BR07, BP1, BP13, BP29, BP30, BP39) e do isolado Belém (colhido em Belém, Pará, em 1980) conservados a -20°C. Estes são os únicos isolados brasileiros que tiveram a PvMSP-1 completamente seqüenciada até o início deste trabalho (Putaporntip et al., 2002). Foram amplificados e utilizados para expressão dos antígenos recombinantes os segmentos do gene que codificam três regiões variáveis da PvMSP-1: bloco 2 (altamente polimórfico), bloco 6 (essencialmente dimórfico) e bloco 10 (altamente polimórfico) (Figura 3). As seguintes versões de cada bloco (representadas na figura 4) selecionadas para expressão estão listadas abaixo:

- Bloco 2: isolados Belém, BR07, BP13, BP29, BP30 e BP39
- Bloco 6: isolados Belém, BR07, BP1 e BP39
- Bloco 10: isolados BR07, BP1, BP13, BP29 e BP39

Ao todo foram produzidos 16 antígenos recombinantes distintos e o controle GST. Esses antígenos representam todo o repertório de seqüências conhecidas encontrado em isolados brasileiros.

A Tabela 2 apresenta as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação por PCR dos segmentos de cada bloco.

Tabela 2 - *Primers* empregados na amplificação das regiões polimórficas (blocos 2, 6 e 10) da proteína de superfície do merozoítio de *P. vivax* (PvMSP-1)

REGIÃO	PRIMER	SEQÜÊNCIA
Bloco 2	<i>Forward: PvF1</i>	5'- CTCTGACAAAGAGCTGGAA -3'
	<i>Reverse: PvR9</i>	5'- GCTCCTTCAGCACTTTTCACGCG -3'
Bloco 6	<i>Forward: PvF4</i>	5'- TACTACTTGATGGTCCTCAAAAG -3'
	<i>Reverse: PvR6</i>	5'- GTGCTTGTGACATGCGTA -3'
Bloco 10	<i>Forward: PvF7</i>	5'- CCTTAAGAATACCGAGATTTTGCTGAAG -3'
	<i>Reverse: PvR3</i>	5'- GCGATTACTTTGTCTAG -3'

Esta amplificação foi realizada utilizando-se o seguinte protocolo (25µl):

Mix da reação (concentração final)	Programa	
Primer forward (0,2 µM)	94° C – 5 min – 1 x	
Primer reverse (0,2 µM)	94° C – 30 seg	35 x
dNTP (100 µM)	55° C – 1 min	
Tampão 10X	72° C – 1 min	
MgCl ₂ (1,5 mM)	72° C – 10 min – 1 x	
Taq polimerase (1,25unidades)	4° C ∞	
Amostra de DNA: 0,5 µl		

Os produtos de PCR amplificados com os pares de *primers* PvF1/PvR9, PvF4/PvR6 e PvF7/PvR3 foram purificados utilizando-se o kit comercial “GFX PCR DNA and gel band purification” (Amersham-Pharmacia, NJ, EUA) e ligados ao vetor TOPO (Invitrogen, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Transformação de bactérias competentes – Os produtos resultantes das ligações (fragmento da PvMSP-1 + plasmídeo TOPO) foram utilizados para transformar bactérias competentes *Escherichia coli* da linhagem DH10B, em incubação em gelo por 30 min seguida de choque térmico de 45 seg em bloco térmico a 42° C, seguido por 30 min de recuperação das bactérias em meio SOC a 37° C.

Crescimento e seleção das colônias – As bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri com meio LB-ágar contendo 100µg/mL de ampicilina e 20µL de IPTG-Xgal (IPTG: isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosida; Xgal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galactosídeo). As placas foram incubadas a 37° C por um período de 8-12 horas. Colônias resistentes à ampicilina possuem o plasmídeo, mas somente as colônias brancas apresentam plasmídeos com inserto, capaz de interromper o gene de β-galactosidase do plasmídeo. As colônias azuis indicam que o plasmídeo não incorporou o inserto de DNA. A seguir, os plasmídeos com inserto foram obtidos de acordo com o protocolo de triagem em pequena escala descrito por Sambrook et al (1989).

Ligação ao vetor de expressão – Plasmídeos PCR-TOPO contendo os insertos correspondentes aos blocos 2, 6 e 10 foram primeiramente

digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* (Fermentas, ON, Canadá) em incubação à 37° C por 2 horas. O produto da digestão foi submetido à eletroforese de gel TAE-agarose 1,5% e os fragmentos correspondentes aos blocos variáveis foram excisados e purificados utilizando-se o kit comercial “GFX PCR DNA and gel band purification” (Amersham-Pharmacia, NJ, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos dos blocos 2 e 10 foram ligados ao vetor de expressão pGEX3X (Amersham-Pharmacia, NJ, EUA), enquanto os fragmentos correspondentes ao bloco 6 foram ligados ao vetor de expressão pGEX3Y (pGEX3X modificado). A ligação foi efetuada com a enzima T4-Ligase (Amersham-Pharmacia, NJ, EUA) em incubação de 30 min a 20° C. Após a incubação, 1 µL do ensaio de ligação (vetor pGEX3X/3Y + fragmento dos blocos repetitivos 2, 6 e 10) foi utilizado para transformar 25 µL de bactérias competentes *E. coli* da linhagem DH10B como descrito anteriormente. A orientação do inserto foi verificada por PCR utilizando-se um *primer forward* (pGEX seq) da região codificadora para GST (a extremidade 5' do inserto) com o *primer reverse* correspondente a cada bloco (Tabela 1) com o seguinte protocolo (volume final de 15 µL):

Mix da reação (concentração final)	Programa	
<i>Primer</i> pGEX seq (0,3 µM)	94° C – 40 seg 55° C – 40 seg 72° C – 40 seg	25 x
<i>Primer reverse</i> (0,3 µM)		
dNTP (250 µM)		
Tampão 10X	72° C – 10 min – 1 x	
MgCl ₂ (1,5 mM)	4° C 8	
<i>Taq</i> polimerase (0,4 unidades)		
Amostra: 1 µL		

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de TAE-agarose 1,5% para verificar a presença de banda no gel (correspondente ao inserto na orientação correta). As colônias com inserto em orientação correta foram selecionadas para expressar as proteínas recombinantes, seguindo o protocolo de produção de proteínas recombinantes com fusão GST (glutathione-S-transferase).

A expressão das proteínas recombinantes foi iniciada cultivando-se uma colônia transformante em 5 mL de meio LB com ampicilina (100µg/mL) a 37° C sob agitação por 8-12 horas. Posteriormente, 3 mL desse pré-inóculo foram adicionados em 100 mL de meio 2YT com ampicilina (100µg/mL) e mantidos a 37° C sob agitação até obter-se uma absorbância de $A_{600} = 0,6$ (aproximadamente 2 horas). À essa cultura adicionou-se 0,3 mM de IPTG e manteve-se a 37° C sob agitação por três horas.

3.2- Purificação das proteínas recombinantes

Para purificar as proteínas recombinantes, a cultura foi centrifugada a 25 x g por 10 min a 4° C. O sedimento foi dissolvido em 2 mL de Triton X100 a 0,5% em solução salina tamponada (PBS) 0,01M, pH7,2. Acrescentou-se 200µg/mL de lisozima e 0,1M de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) e manteve-se sob leve agitação por 5 min em temperatura ambiente. Foram realizados cinco ciclos de congelamento e descongelamento utilizando N₂ líquido e banho-maria a 37° C. A lise mecânica do genoma bacteriano foi

realizada passando-se a suspensão 10 vezes por seringa com agulha de calibre 25 G. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 25 x g por 15 min a 4° C.

Ao sobrenadante foram adicionados 200 µL de glutathiona-sepharose (Amersham-Pharmacia, NJ, EUA) previamente lavada em PBS. Realizou-se incubação em temperatura ambiente por 1 hora sob leve agitação. A suspensão foi lavada com 2 mL de PBS por três vezes. Ao precipitado foram adicionados 750 µL de solução de eluição (TrisHCl 0,1 M, pH 8,0, NaCl 0,12M, glutathiona 10 mM) e manteve-se sob leve agitação por 45 min em temperatura ambiente. O novo sobrenadante foi recolhido por centrifugação a 80 x g de 1 min.

Para completar o processo de purificação, as proteínas recombinantes foram dialisadas contra um grande volume de PBS (2000mL), a 4°C por 18 horas. As proteínas foram quantificadas utilizando-se o método de Bradford (1976).

3.3- SDS-PAGE

SDS-PAGE – A pureza das proteínas recombinantes foi testada realizando-se eletroforese de 15 µL de cada proteína em gel de poliacrilamida 4,5% (*stacking gel*) e 12% (*running gel*) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% em condições desnaturantes (Laemli, 1970). As proteínas foram aplicadas no gel com tampão de amostra (TrisHCl 0,01 M, pH 6,8; SDS 1%,

glicerol 10%, azul de bromofenol 0,06%) após desnaturação por aquecimento em bloco térmico à 95° C por 5 min. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 120 V até que a coloração do azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior do gel.

Após a eletroforese, o gel foi corado por solução de azul de *Comassie* (*Comassie blue* 0,3%, ácido acético glacial 7%, metanol 40%, água destilada) sob agitação por 10 minutos. O excesso de corante foi retirado por solução descorante (ácido acético glacial 7,5%, metanol 5%, água destilada) sob agitação.

3.4- Immunoblotting

Immunoblotting – O reconhecimento desses antígenos recombinantes por anticorpos de indivíduos naturalmente expostos a *P. vivax* foi testado por “*Immunoblotting*”. (Towbin et al., 1979). Com esta finalidade, as proteínas separadas por eletroforese foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose (Hybond C, Pharmacia, NJ, EUA), por 90 min sob corrente constante de 250 mA. Após a transferência, a membrana foi corada por 5 min com Ponceau 0,2% em ácido acético 1%.

Bloqueio – Posteriormente à coloração, a membrana foi cortada verticalmente em fitas (duas fitas para cada antígeno) e cada fita foi incubada sob leve agitação por 1 h em temperatura ambiente em leite

desnatado a 5% em PBS contendo Tween 20 a 0,1%. Realizou-se então duas lavagens com PBS-Tween-0,1%.

Reação – A primeira fita de cada antígeno foi incubada em temperatura ambiente com *pool* de soros positivos de pacientes com malária vivax, diluído a 1/100 em leite desnatado a 1% em PBS-Tween-0,1% sob leve agitação por 1 h. A segunda fita de cada antígeno foi incubada com soro negativo sob as mesmas condições. Seguiu-se nova etapa de lavagem.

Conjugado – As fitas foram incubadas, sob leve agitação, por 1 h em temperatura ambiente, com anticorpo de carneiro anti-IgG humano marcado com peroxidase (Amersham-Pharmacia, NJ, EUA) diluída a 1/1500 em leite desnatado a 1% em PBS-Tween-0,1%. Seguiu-se nova etapa de lavagem.

Revelação – As fitas foram reveladas com ECL – Western blotting detection reagents (Amersham, Pharmacia, NJ, EUA) e expostas ao filme Hyperfilm (Pharmacia, Pharmacia, NJ, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

4- Análise do reconhecimento de regiões variáveis da PvMSP-1 por anticorpos de habitantes de área endêmica do Acre

O padrão de reconhecimento por anticorpos IgG e IgM das regiões variáveis da PvMSP-1 e da região constante PvMSP-1₁₉ foi analisado por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), com as amostras de soro dos grupos 2 e 4, segundo protocolo descrito a seguir:

SENSIBILIZAÇÃO – Microplacas de 96 cavidades (Costar High Binding, NY, EUA) foram sensibilizadas com 50 µL das proteínas recombinantes e do antígeno-controle (GST) em concentração de 0,1 µg/mL diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 (TCB) e incubadas por 18 h em 4° C.

BLOQUEIO – Após a incubação, as microplacas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e os sítios remanescentes foram bloqueados com leite desnatado (Molico- Nestlé®) a 5% em PBS-Tween-0,05% (200 µL/cavidade) por 2 h a 37°C. Após nova incubação, as microplacas foram lavadas 3x consecutivas com PBS-Tween 0,05%.

REAÇÃO – AS amostras de soros diluídas a 1/200 em PBS foram adicionadas (50 µL) em cada cavidade da microplaca e incubadas por 1 h a 37° C. Após incubação, repetiu-se o processo de três lavagens com PBS-Tween 0,05%.

CONJUGADO – OS anticorpos de carneiro anti-IgG humano conjugados com peroxidase (Kirkegaard & Perry, MD, EUA) foram diluídos a 1/4000 em PBS-Tween 0,05% contendo 1% de leite desnatado e adicionados (50 µL) em cada cavidade. Foram repetidas a incubação de 1 h em temperatura de 37° C e as três lavagens com PBS-Tween 0,05%.

Os anticorpos de carneiro anti-IgM humano conjugados com peroxidase (BioSys, France) foram diluídos a 1/1200 em PBS-Tween 0,05% com 1% de leite desnatado. As etapas de incubação e lavagem foram realizadas de maneira idêntica ao conjugado IgG.

O substrato cromogênico orto-fenilediamina (OPD) (Sigma Chem. Co., MO, EUA) foi dissolvido em tampão citrato-fosfato (TCF) e H₂O₂ (água

oxigenada) seguindo as orientações do fabricante e 50 µL do substrato foram adicionados em cada cavidade da microplaca, que foi incubada em temperatura ambiente e protegida da luz por 30 min. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 50 µL de HCl 2N em cada cavidade. A densidade óptica (DO) foi medida em leitora Biorad com filtro de 492 nm. A DO das amostras obtida do espectrofotômetro foi subtraída do valor da DO da GST.

Para controlar a variação inter-placas, calculamos a mediana das DOs de um soro controle positivo que foi testado em todas as placas e escolhemos como placa padrão para cada antígeno a placa cujo controle positivo estivesse igual ou mais próximo dessa mediana.

Calculamos o K (coeficiente de variação) de cada placa para cada antígeno, aplicando a seguinte equação:

$$K = \frac{DO\ C^+ \text{ placa padrão}}{DO\ C^+}$$

A DO das amostras foi multiplicada pelo K de sua respectiva placa e o *cut-off* foi determinado a partir da média dos 21 controles negativos mais 2 vezes o desvio padrão para IgG e 3 vezes o desvio padrão para IgM. Para definir amostras positivas e negativas calculamos o índice de reatividade:

$$IR = \frac{DO_{amostra}}{cut - off}$$

5- Análise da variação de seqüência de PvMSP-1 em isolados do Acre

Amostras de sangue dos grupos 1 e 3 foram empregadas para o estudo de diversidade de seqüência de PvMSP-1 em isolados de *P. vivax* do Acre. O DNA genômico dessas amostras foi extraído com emprego do protocolo de extração fenol/clorofórmio e precipitado com etanol, de acordo com o descrito por Snounou et al (1993) e modificado por Ferreira et al (1998).

Desses isolados, foram amplificados os segmentos da PvMSP-1 que codificam os blocos variantes 2, 6 e 10, que correspondem exatamente aos fragmentos utilizados para expressão das variantes de PvMSP-1 como antígenos recombinantes. Na tabela 1 foram apresentadas as seqüências dos *primers* que foram utilizados para a amplificação destes segmentos por PCR, com base no protocolo descrito abaixo:

Mix da reação (concentração final)	Programa	
Primer forward (0,2 µM)	94° C – 5 min – 1 x	
Primer reverse (0,2 µM)	94° C – 30 seg	36 x
dNTP (200 µM)	55° C – 1 min	
Tampão 10X	72° C – 1 min	
MgCl ₂ (1,5 mM)	72° C – 10 min – 1 x	
Taq polimerase (1,25unidades)	4° C ∞	
Amostra de DNA: 2,0 µL		

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit GFX 96 PCR Purification (Amersham-Pharmacia, NJ, EUA) e submetidos a seqüenciamento direto, utilizando o kit Big Dye (Applied Biosystems, CA, EUA) em seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, CA,

EUA). Os *primers* utilizados na reação de seqüenciamento são exatamente aqueles utilizados para amplificar os fragmentos de interesse (tabela 1). As reações de seqüenciamento foram realizadas em ambas as fitas de DNA, conforme o seguinte protocolo:

Mix da reação (volume final: 15 µL)	Programa	
DNA (~ 100-200ng)	96° C – 2 min – 1x	
Primer (0.64 pmoles)	96° C – 45 seg	35 x
Tampão de seqüenciamento 5X	50° C – 30 seg	
1 µL de BigDye v3.1	60° C – 4 min	
	4° C ∞	

O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado adicionando-se 25 µL do *cocktail* de precipitação, incubado em gelo por 15 min e centrifugado a 3220 x g por 30 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado por inversão e 50 µL de etanol 70% foi adicionado e as etapas de centrifugação e descarte de sobrenadante repetidas. Finalizando, o produto da reação de seqüenciamento foi seco por aquecimento a 95° C por 1 min e armazenado a -20° C. O seqüenciamento foi feito pelo Serviço de Seqüenciamento do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Química da Universidade de São Paulo.

As seqüências resultantes foram alinhadas para obtenção da seqüência consenso utilizando-se o programa DNASTAR. As seqüências consenso foram alinhadas com os haplótipos (alelos) descritos por Putaporntip e colaboradores (2002) utilizando-se os programas Mega 3.1 e DNAsp 4.0. A

partir deste alinhamento obteve-se o haplótipo de cada sequência. As seqüências de DNA foram depositadas no banco de dados GenBank (números de acesso: EF651844 – EF651876).

6- Análise estatística

Todas as análises estatísticas e dos dados descritivos foram realizados no Programa Sigma Stat (versão 1.0, Jandel Scientific) e Prisma (versão 3.0, GraphPad software, Inc). Quando os resultados a serem analisados apresentavam distribuição normal foram usados testes estatísticos paramétricos e quando não apresentavam distribuição normal foram usados testes estatísticos não paramétricos. Os resultados dos índices de reatividade dos anticorpos foram apresentados em medianas. As comparações entre dois grupos para amostras independentes foram feitas pelos testes paramétrico t de Student e não paramétrico Mann-Whitney. As comparações entre grupos múltiplos para amostras independentes foram feitas pelo teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) e pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis. As comparações entre as frequências e proporções foram feitas pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) e teste de Fischer (para pequenas casuísticas). Correlações entre diferentes variáveis foram feitas pelos métodos de Pearson e de Spearman. Todas as probabilidades dos testes foram feitas para um nível de significância de 95%.

Foram usados dois modelos de regressão logística para determinação de variáveis preditoras de exposição à malária, controlando covariáveis

associadas ao risco de malária na população, um dos modelos utilizou variáveis individuais (idade, sexo, tempo de residência na Amazônia e episódios recentes de malária por *P. vivax* confirmados por gota espessa) e o outro utilizou variáveis de grupo (padrão socioeconômico estimado pelo uso de um índice de posse de bens e setor de localização da residência dentro da área de estudo). A diferença na transmissão de malária nos diferentes setores da área de estudo foi analisada com o programa HML (versão 6.03, Scientific Software International, Lincolnwood, IL). Somente variáveis associadas com nível de significância de 95% foram mantidas no modelo final.

IV- RESULTADOS

1- Caracterização dos antígenos recombinantes

Foram expressas 16 proteínas recombinantes e o controle GST. A figura 6 apresenta as proteínas analisadas em SDS-PAGE. A concentração das proteínas de fusão obtidas variou de 0,09 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 1,20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 6- SDS-PAGE das proteínas recombinantes das regiões variáveis do bloco 2 (A e B), bloco 6 e GST (C) e do bloco 10 (D) da proteína principal da superfície do merozoíto (MSP-1) de *P. vivax*, expressas em fusão com GST

O reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos de indivíduos naturalmente expostos à malária foi avaliado por *immunoblotting*. Os ensaios demonstraram que esses indivíduos produzem anticorpos que reconhecem as proteínas recombinantes produzidas (Figura 7).

Figura 7- *Immunoblotting* de proteínas recombinantes (BP29-2, BP39-6 e BP1-10) de regiões variáveis da proteína de superfície do merozoíto (MSP-1) de *P. vivax*. Membrana cortada em fitas e incubadas com “pool” de soro de indivíduos expostos à malária (+) e de soro controle negativo (-) para testar a antigenicidade e dos antígenos recombinantes. Diluição dos soros: 1/100.

Na figura 8 são apresentadas as seqüências de aminoácidos dos domínios variáveis de cada antígeno recombinante.

Block 2

Block 2a

Belém ETISNINKLISDENAKRGQSTNTTNGTGAQNNAQ
 BP29 ITIKNI~~SDLI~~IAENKKRS~~GHPT~~TTTNGAGTQPANGSIAAASSETTQIS
 BP39 ETISNINKLISDENAKRGSQSTNTTNGTGAQNNAQ
 BP13 ITIKNI~~SDLI~~IAENKKRS~~GHPT~~TTTNGAGTQPANGSIAAASSETTQIS
 BR07 KTIDNINKLISDENAKRGQYTD~~MING~~NGTQADGTQGTGSSETTQNS
 BP30 DTIKKI~~SDLI~~TEEHKKRGQY~~TS~~ISGNGAQT~~DGH~~QTTASSETSSGSSVSSVS

Block 2b

Belém -----GSTGN
 BP29 GSSNSGSSGTGSSNSGSSGTGSSNSGSSGTGSTGN
 BP39 -----GSTGN
 BP13 GSSNSGSTGHGSSNS-----GSSGTGSTGN
 BR07 GSSGTGSSDS-----GSSGTGSTGN
 BP30 GSSNS-----GSSGTGSTGN

Block 2c

Belém TETGTRSSASSNTLSGGDGTTVGTSSPAPAAPSSSTNEDYDEKKKIYQAMYNGIFYTSQLE
 BP29 -----GQSPPATADASSTNANYEAKKIYQAIYNGIFYTNQLE
 BP39 TETGTQSSASSNTLSGGAGTTVGTSSPAPAAPSSSTNANYEAKKIYQAIYNGIFYTNQLE
 BP13 -----GQSPPATADASSTNANYEAKKIYQAIYNGIFYTNQLE
 BR07 -----ISHPAAPAASSPTDENYTNKKAI~~FQ~~AVYNIIFYTNLKE
 BP30 -----RSSSQARADSRSTD~~TD~~DYNAKKI~~IF~~QAVYNTIFYTNQLQ

Block 6

Belém AKPAASAPVTSGQLLRGSSEAATEVTTNAVTSSEV-----QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQSQVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAP
 BP39 NKP~~TVAA~~ADIVAKGQSLRGASET~~GT~~TGNTVNAQTAVV-----QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ-S-LVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAP
 BR07 AKPAASAPVTSGQLLRGSSEAATEVTTNAVTSSEV-----QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQSQVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAP
 BP01 NKP~~TVAA~~ADIVAKGQSLRGASET~~GT~~TGNTVNAQTAVVQQPQHQVANAVTVQPGTGHQAQGGAEETQ~~TNSVQ~~AAQVQOT~~PAGAGGQVASTQTTSQAPAPTQASPEPAPAVPPS~~

Block 10

BP29 STSVA-----VTVPGAVVPG-----VPTAAAAGSGASGAVPPAAAAGSGASGAVPPAGGPPSPATGGVVPGVVESAEAQTKAQ
 BP39 GAS~~TTAA~~TLPVTVPSAV-PGGLPGAGVPGAAA-GLT---PPPPAGSVPATGPGAAA-----GSTEENVAAK
 BP13 STSVA-----VTVPGAVVPG-----VPTAAAAGSGASGAVPPAGSVPATGPGAAA-----GSTEENVAAK
 BR07 STSVA-----VTVPGAVVPG-----VPTAAAAGSGASGAVP-----PATGPGAAA-----GSTEENVAAK
 BP01 GASAP~~AAA~~-VTVPGAGVPA~~AAAVT~~-VPGAGVPAAGV---VPGA---PA---GAA-PAGAAPAGAA-----PSAPGAQEQTQTQ

Block 13 (MSP-1₁₉)

Belém SSEHTCIDTNVPD~~NAAC~~YRYLDGTEEWRC~~LLT~~FKEEGGKCVPASNV~~TCK~~DNNGGCAPEAECKMTDSNKIVCKCTKEGSEPLFEGVFCSSSSFLSL~~SF~~LLMLLFLLCMEL

Figura 8- Sequências de aminoácidos dos blocos variáveis 2, 6 e 10 e da porção 3' do bloco 13 (MSP-1₁₉). Todas as sequências foram expressas como proteínas recombinantes em fusão com GST. O bloco 2 é dividido em segmentos 2a, 2b e 2c, segundo classificação de Putaporntip et al., 2002

2- Seqüenciamento dos blocos variáveis 2, 6 e 10 da PvMSP-1 dos casos positivos de *P. vivax* ocorridos durante o seguimento dos indivíduos

Dos 157 indivíduos infectados por *P. vivax* durante o período do estudo, obteve-se 70 amostras de sangue que foram processadas e as regiões correspondentes aos blocos 2, 6 e 10 da PvMSP-1 seqüenciadas.

A partir das reações de seqüenciamento foram obtidas 53 seqüências do bloco variável 2 (41 provenientes das amostras de sangue colhidas durante o estudo longitudinal e 12 provenientes das amostras colhidas em 1999), 69 seqüências do bloco 6 (50 do estudo longitudinal e 19 de 1999) e 59 seqüências do bloco 10 (42 do estudo longitudinal e 17 de 1999).

A análise das seqüências identificou 8 haplótipos no bloco 2, 14 haplótipos no bloco 6 e 11 haplótipos no bloco 10. As seqüências de aminoácidos dos haplótipos dos blocos variáveis 2, 6 e 10 são apresentadas nas figuras 9, 10 e 11. Nenhum desses blocos pode ser definido como estritamente dimórfico, pois nem todas as seqüências podem ser agrupadas como tipo Belém ou como tipo Salvador-I, já que algumas seqüências divergem claramente de ambos os tipos e muitas delas são geradas por recombinação entre os tipos.

A comparação entre os haplótipos e as seqüências dos antígenos recombinantes mostra que seqüências de quatro antígenos do bloco 2 (BR7, BP13, BP29 e BP39) foram encontradas nos parasitos locais. Do bloco 6, duas seqüências de antígenos (BR7 e BP39) foram encontradas nos parasitos locais e no bloco 10, das cinco seqüências de antígenos estudadas, quatro (BR7, BP13, BP29 e BP39) foram encontradas nos parasitos locais. Os demais antígenos têm seqüências muito similares apesar de não idênticas, à seqüência de no mínimo uma das variantes encontradas em isolados locais (similaridade de aminoácidos, 91,2 – 98,2%). A tabela 3 apresenta a correspondência entre os haplótipos e os antígenos recombinantes, bem como a freqüência em que cada haplótipo foi encontrado na população estudada.

Tabela 3 - Associação entre haplótipos e antígenos recombinantes dos blocos variáveis 2, 6 e 10 da MSP-1 de *P. vivax* e a frequência dos haplótipos obtidos de amostras de sangue positivas para *P. vivax* de indivíduos residentes em área endêmica de malária em duas épocas diferentes, 1999 e 2004-2005

HAPLÓTIPO	ANTÍGENO CORRESPONDENTE (% DE SIMILARIDADE)	FREQUÊNCIA NA POPULAÇÃO	
		1999 Número de amostras seqüenciadas	2004-2005
Bloco 2		12	41
I	BP30-2 (83%)	---	31,7%
II	BR07-2 (100%)	8,3%	14,6%
III	BP39-3 (100%)	50%	41,5%
IV	BP30-2 (79,9%)	---	2,4%
V	BR07-2 (96,6%)	---	2,4%
VI	BP13-2 (100%)	---	2,4%
VII	BP30-2 (85,4%)	8,3%	---
VIII	BP30-2 (100%)	33,3%	2,4%
Bloco 6		19	50
I	BR07-6 (100%)	15,8%	26%
II	BR07-6 (99,1%)	---	2%
III	BP39-6 (81,4%)	---	2%
IV	BP39-6 (93,8%)	---	2%
V	BP39-6 (95,2%)	---	26%
VI	BP39-6 (96,2%)	---	2%
VII	BP39-6 (100%)	---	18%
VIII	BP39-6 (96,3%)	---	12%
IX	BP39-6 (96,6%)	---	2%
X	BP1-6 (96,6%)	68,4%	---
XI	BP1-6 (95,5%)	10,5%	---
XII	BP1-6 (98,1%)	5,3%	---
XIII	BP1-6 (97,5%)	---	6%
XIV	BP1-6 (96,3%)	---	2%
Bloco 10		17	32
I	BP29-10 (78%)	---	21,9%
II	BP29-10 (77,1%)	---	3,1%
III	BP29-10 (74,9%)	5,9%	---
IV	BP13-10 (100%)	---	6,3%
V	BR07-10 (100%)	17,6%	50%
VI	BP29-10 (100%)	5,9%	3,1%
VII	BP29-10 (97,7%)	58,8%	---
VIII	BP13-10 (92,6%)	5,9%	---
IX	BP39-10 (100%)	5,9%	40,6%
X	BP39-10 (98,2%)	---	3,1%
XI	BR07-10 (91,2%)	---	3,1%

3- Resposta de anticorpos das classes IgG e IgM contra os antígenos recombinantes da MSP-1 de *P. vivax* no *baseline*

Foi investigada a resposta de anticorpos das classes IgG e IgM contra as diferentes proteínas recombinantes dos blocos 2, 6, 10 e 13 (MSP-1₁₉) da MSP-1 de *P. vivax* por ELISA em 376 amostras de soro de indivíduos colhidas no *baseline*. Os valores dos *cut-offs* são apresentados no anexo VII. Os resultados em níveis de anticorpos determinados por índices de reatividade são apresentados nos anexos VIII, IX e X (medianas, IRs individuais de IgG e IRs individuais de IgM, respectivamente).. O gráfico da figura 12 mostra a proporção de indivíduos com anticorpos das classes IgG e IgM contra os antígenos recombinantes que representam diferentes variantes e domínios da PvMSP-1.

Figura 12- Frequências de anticorpos das classes IgG e IgM contra diferentes antígenos recombinantes dos blocos variáveis 2, 6 e 10 e da região conservada C-terminal (PvMSP-1₁₉) da proteína de superfície do merozoíto de *P. vivax* (PvMSP-1) em 376 amostras de soro de indivíduos residentes em área endêmica de malária

A região C-terminal MSP-1₁₉ foi reconhecida por anticorpos IgG e IgM de 54,3% e 6,9% dos indivíduos residentes em área endêmica de malária, respectivamente. Os antígenos das regiões variáveis da PvMSP-1 foram menos reconhecidos, sendo que o reconhecimento por anticorpos IgG dos antígenos do bloco 2 variou de 9,31 a 16,76% ($\mu=13,21\%$), dos antígenos do bloco 6 variou de 7,71 a 24,2% ($\mu=12,57\%$) e dos antígenos do bloco 10 variou de 3,99% a 13,83% ($\mu=10,69\%$) dos indivíduos. O reconhecimento por anticorpos IgM dos antígenos do bloco 2 variou de 0 a 9,04% ($\mu=4,26\%$), dos antígenos do bloco 6 de 1,33 a 7,45% ($\mu=5,06\%$) e dos antígenos do bloco 10 variou de 2,93 a 5,32% ($\mu=3,99\%$).

Ao analisarmos a proporção de amostras de soro reagentes a pelo menos um antígeno de cada bloco variável (Figura 13), observamos que o bloco 2 foi o mais freqüentemente reconhecido por anticorpos IgG (32,99%), seguido pelos blocos 10 e 6 (28,19% e 27,66% respectivamente). Para anticorpos IgM, o bloco 2 também foi o mais freqüentemente reconhecido (18,62%), seguido pelo bloco 6 (16,49%) e finalmente o bloco 10 (11,17%).

Figura 13- Frequência de anticorpos das classes IgG e IgM nas amostras de soro de 376 indivíduos contra pelo menos um dos antígenos recombinantes de cada bloco variável da MSP-1 de *P. vivax*. Bloco 2: antígenos Belém, BR7, BP13, BP29, BP30, BP39; Bloco 6: Belém, BR7, BP1, BP39; Bloco 10: BR7, BP1, BP13, BP29, BP39

Os níveis de anticorpos IgG contra todos os antígenos recombinantes da região variável (bloco 2) da PvMSP-1 diferiram entre si ($P < 0,0001$), com exceção dos anticorpos IgG contra os antígenos BR7-2 e BP29-2. Os maiores níveis de anticorpos IgG encontrados foram contra os antígenos BP13-2 e BP39-2. Para os antígenos do bloco 6, os maiores níveis de anticorpos IgG observados foram contra o BP1-6 ($P < 0,0001$), seguido pelos

antígenos BR7-6 e BP39-6, que apresentaram medianas semelhantes. Os níveis de anticorpos IgG contra os antígenos recombinantes do bloco 10 também diferiram significativamente ($P < 0,0001$), com exceção dos antígenos BP29-10 e BP39-10. Os maiores níveis foram contra o antígeno BP29-10.

Em relação aos antígenos do bloco 2, os maiores níveis de anticorpos IgM foram contra o antígeno Belém-2 e os menores níveis contra o antígeno BP29-2 ($P < 0,0001$). Também houve diferença significativa contra os antígenos do bloco 6 ($P < 0,0001$), com maiores níveis contra os antígenos Belém-6 e BR7-6. Entre os antígenos do bloco 10, os maiores níveis de anticorpos IgM foram contra o antígeno BP29-10 ($P < 0,0001$), seguido pelos antígenos BP39-10 e BP13-10.

3.1- Correlação dos níveis de anticorpos da classe IgG contra os antígenos recombinantes das regiões variáveis de PvMSP-1 e os respectivos graus de identidade entre as seqüências de aminoácidos

Na tabela 4 apresentamos os níveis de identidade entre as proteínas recombinantes dos blocos variáveis 2, 6 e 10 e as análises de correlação entre os níveis de anticorpos IgG contra os diferentes antígenos de cada bloco. Os coeficientes de correlação variaram grandemente, com as maiores estimativas obtidas em pares de antígenos com seqüências de aminoácidos relativamente similares, como por exemplo, BP13/BP29 e Belém/BP39 são os pares de antígenos do bloco 2 com a maior porcentagem de identidade

dos aminoácidos (96,4% e 93,0%, respectivamente) e aqueles com os coeficientes de correlação mais altos para os níveis de IgG (0,675 e 0,589, respectivamente).

Tabela 4 - Porcentagem de similaridade de aminoácidos na comparação de variantes da PvMSP-1 expressas como antígenos recombinantes e coeficientes de correlação de Spearman ρ dos níveis de anticorpos da classe IgG contra essas variantes

REGIÃO E ANTÍGENO		PORCENTAGEM DE SIMILARIDADE DE AMINOÁCIDOS (DIAGONAL SUPERIOR) E CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE ANTICORPOS IGG (DIAGONAL INFERIOR)					
Bloco 2		Belém	BR7	BP13	BP29	BP30	BP39
	Belém	-	66,9	67,5	67,5	63,7	93,0
	BR7	0,494	-	68,9	69,6	71,4	67,5
	BP13	0,327	0,497	-	96,4	69,8	70,7
	BP29	0,470	0,569	0,675	-	71,0	70,7
	BP30	0,318	0,333	0,443	0,522	-	65,0
	BP39	0,589	0,560	0,427	0,564	0,455	-
Bloco 6		Belém	BR7	BP1	BP39		
	Belém	-	97,9	59,5	80,4		
	BR7	0,707	-	61,4	81,4		
	BP1	0,468	0,551	-	73,9		
	BP39	0,687	0,736	0,576	-		
Bloco 10		BR7	BP1	BP13	BP29	BP39	
	BR7	-	80,1	93,4	87,3	86,7	
	BP1	0,245	-	74,2	71,7	77,1	
	BP13	0,545	0,270	-	88,7	82,3	
	BP29	0,319	0,023	0,450	-	71,4	
	BP39	0,468	0,213	0,563	0,505	-	

Quando analisamos os resultados considerando o grau de identidade entre os diferentes isolados de cada bloco, observamos que houve

correlação significativa entre as porcentagens de identidade e os respectivos coeficientes de correlação para os blocos 2 ($r = 0,6316$, $P < 0,0116$) e bloco 6 ($r = 0,8578$, $P = 0,0289$) (correlação de Pearson). Para o bloco 10 não houve correlação significativa ($r = 0,5521$, $P = 0,0980$) (Figura 14).

Figura 14 - Regressão linear das porcentagens de identidade entre os blocos variáveis 2, 6 e 10 da MSP-1 de *P. vivax* e dos coeficientes de correlação entre os níveis de anticorpos IgG contra os respectivos antígenos

3.2- Análise dos resultados de anticorpos em relação à exposição cumulativa à malária

Foi investigado como a exposição cumulativa ou recente à malária afeta o reconhecimento de anticorpos contra os diferentes antígenos da PvMSP-1, usando como variáveis de exposição à malária: idade, tempo de residência na Amazônia, local de residência em Acrelândia e ocorrência de malária recente, considerando como malária recente a ocorrência de episódios de malária vivax confirmados por gota espessa entre janeiro de 2001 e março de 2004. Dos 376 indivíduos, 133 tiveram malária recente durante o período estipulado e 243 não tiveram.

Nenhuma correlação significativa foi observada entre níveis de anticorpos IgG e a idade. Já para os anticorpos IgM foram observadas correlações negativas com contra os antígenos Belém-2 ($\rho = -0,1062$), BP30-2 ($\rho = -0,240$), BP39-2 ($\rho = -0,134$), BR7-10 ($\rho = -0,1157$), BP1-10 ($\rho = -0,230$), BP13-10 ($\rho = -0,240$), BP29-10 ($\rho = -0,250$) e BP39-10 ($\rho = -0,200$) (correlação de Spearman).

O tempo de residência na Amazônia apresentou correlação positiva com os níveis de anticorpos IgG (em IRs) contra os antígenos BP39-2 ($\rho = 0,107$), BR7-6 ($\rho = 0,108$), BP1-6 ($\rho = 0,137$), BR7-10 ($\rho = 0,138$) e BP29-10 ($\rho = 0,125$).

Analizamos os níveis (IRs) e a frequência de anticorpos IgG e IgM em relação à presença ou não de malária recente. Para a maioria dos antígenos das regiões variáveis da PvMSP-1 não existiu diferença significativa entre os

níveis de anticorpos IgG dos indivíduos que tiveram malária recente dos que não tiveram ($P > 0,05$). Níveis maiores de anticorpos IgG contra os antígenos BP1-6 e BP29-10 foram observados nos indivíduos que tiveram malária recente ($P = 0,04$ e $P < 0,0001$, respectivamente) e maiores níveis de anticorpos IgG contra o antígeno BP1-10 nos indivíduos que não tiveram malária recente ($P = 0,001$). Os níveis de anticorpos IgG contra a PvMSP-1₁₉ foram significativamente maiores nos indivíduos que tiveram malária recente ($P < 0,0001$). Em geral, os níveis de anticorpos IgM não diferiram entre os indivíduos que relataram malária recente e os que não relataram, apenas contra o antígeno BP1-6 foram observados maiores níveis de IgM nos indivíduos com malária recente ($P < 0,0001$).

Foram usados modelos de regressão logística para determinar se exposição cumulativa ou recente à malária predizia a presença de anticorpos IgG para a PvMSP-1 controlando covariáveis supostamente associadas com risco de malária, tais como idade, sexo, local de residência e padrão sócio-econômico.

O tempo de residência na Amazônia, medida que apresentou correlação positiva com os níveis de anticorpos, foi um forte preditor da presença de anticorpos IgG a pelo menos uma versão dos blocos 6 e 10 [*odds ratio* ajustada (aOR), 1,04; intervalo de confiança (IC), 1,02-1,07, $P = 0,001$; resultados idênticos para os blocos 6 e 10]. Ou seja, cada ano adicional de exposição à malária aumentou em 4% a probabilidade do indivíduo apresentar anticorpos IgG contra pelo menos um antígeno do bloco 6 e do bloco 10 (IC 95%, 2-7%).

A ocorrência de malária recente por *P. vivax* foi um forte preditor da presença de anticorpos IgG apenas contra a PvMSP-1₁₉ (aOR, 4,16; IC 95%, 2,41-7,18, $P < 0,0001$), mas não contra os outros antígenos.

Como esperado, o local de residência também foi significativamente associado à presença de anticorpos IgG em todos os modelos.

Juntos, estes resultados mostram que a exposição cumulativa à malária prediz a presença e os maiores níveis de anticorpos IgG contra muitos dos antígenos variáveis da PvMSP-1, enquanto a exposição recente à malária foi um forte preditor da presença e de maiores níveis de anticorpos IgG à porção C-terminal da PvMSP-1 (PvMSP-1₁₉).

4- Resposta de anticorpos das classes IgG e IgM contra os antígenos recombinantes da MSP-1 de *P.vivax* durante os episódios de malária vivax

Durante o seguimento clínico e laboratorial dos indivíduos pelo período de 15 meses, 157 indivíduos tiveram episódios de malária vivax. Dos 376 indivíduos incluídos no *baseline*, 40 tiveram amostra de soro colhida durante o episódio (11 indivíduos tiveram 2 episódios, 2 tiveram 3 episódios e 1 teve quatro episódios de malária vivax).

Foram pesquisados anticorpos das classes IgG e IgM contra as diferentes proteínas recombinantes dos blocos 2, 6, 10 e 13 da PvMSP-1 por ELISA. As medianas dos índices de reatividade de IgG e IgM apresentadas pelos 40 indivíduos no primeiro episódio de malária vivax detectado (T1)

estão dispostos no anexo XI (resultados individuais de IgG e IgM estão nos anexos XII e XIII).

Os níveis de anticorpos IgG aumentaram para a maioria dos indivíduos durante o episódio de malária, sendo que a mediana dos IRs foi significativamente maior durante o episódio de malária contra todos os antígenos variáveis ($P < 0,0001$). Os níveis de anticorpos IgG contra a PvMSP-1₁₉ diminuíram durante o episódio de malária vivax ($P < 0,0001$).

Nas figuras 15, 16 e 17 estão representadas as variações nos níveis de anticorpos IgG contra os diferentes antígenos (blocos 2, 6 e 10 respectivamente) em cada indivíduo que teve duas malárias (T1 e T2) durante o seguimento (n=11).

Figura 15- Variação dos níveis de anticorpos da classe IgG medidos por índice de reatividade (IR) contra os antígenos variáveis do bloco 2: Belém, BR7, BP13, BP29, BP30 e BP39 em amostras de soro dos 11 indivíduos que tiveram dois episódios de malária vivax durante o seguimento. T0: amostras colhidas no *baseline*. T1: amostras colhidas no 1º episódio de malária incidente. T2: amostras colhidas no 2º episódio de malária incidente. Cada linha representa um indivíduo

Figura 16- Variação dos níveis de anticorpos da classe IgG medidos por índice de reatividade (IR) contra os antígenos variáveis do bloco 6: Belém, BR7, BP1 e BP39 em amostras de soro dos 11 indivíduos que tiveram dois episódios de malária vivax durante o seguimento. T0: amostras colhidas no *baseline*. T1: amostras colhidas no 1º episódio de malária incidente. T2: amostras colhidas no 2º episódio de malária incidente. Cada linha representa um indivíduo

Figura 17- Variação dos níveis de anticorpos da classe IgG medidos por índice de reatividade (IR) contra os antígenos variáveis do bloco 10: BR7, BP1, BP13, BP29, BP39 e o antígeno da região conservada C-terminal (PvMSP-1₁₉) em amostras de soro dos 11 indivíduos que tiveram dois episódios de malária vivax durante o seguimento. T0: amostras colhidas no *baseline*. T1: amostras colhidas no 1º episódio de malária incidente. T2: amostras colhidas no 2º episódio de malária incidente. Cada linha representa um indivíduo

Nas figuras 18 e 19 apresentamos, respectivamente, as proporções de indivíduos com respostas de anticorpos IgG e IgM contra os diferentes antígenos recombinantes da PvMSP-1 no *baseline* (T0) e no momento do episódio de malária (T1). A proporção de indivíduos respondedores foi maior significativamente em T1 para os antígenos BR7-2, BP29-2, BP39-2, BP1-6, BP39-6 e todos os antígenos do bloco 10 ($P < 0,05$). Contra o antígeno BP30-2 a proporção de respondedores foi menor em T1, mas sem diferença significativa. A proporção de respondedores contra a PvMSP-1₁₉ foi semelhante em T0 e T1 ($P > 0,05$). As proporções de indivíduos com anticorpos IgM contra os diferentes antígenos foram semelhantes em T0 e T1, com exceção de anticorpos contra o antígeno BR7-10, cuja proporção de positivos foi maior em T1 ($P < 0,05$).

Figura 18- Frequências de positividade de anticorpos da classe IgG contra os diferentes antígenos recombinantes da PvMSP-1 dos 40 indivíduos que apresentaram episódios clínicos de malária vivax durante o seguimento. T0= *baseline*, T1= durante o episódio

Figura 19- Frequências de positividade de anticorpos IgM contra os diferentes antígenos recombinantes da PvMSP-1 dos 40 indivíduos que apresentaram episódios clínicos de malária vivax durante o seguimento. T0= *baseline*, T1= durante o episódio

A maioria das amostras de indivíduos expostos a variantes conhecidas da PvMSP-1 apresentaram anticorpos IgG que reconheceram no mínimo um antígeno recombinante de cada bloco variável, as proporções de respondedores foram 91,3% (21 de 23) para os antígenos do bloco 2; 78,6% (22 de 28) para o bloco 6 e 100% (27 de 27) para o bloco 10. A PvMSP-1₁₉ apresentou alta imunogenicidade 92,5% (37 de 40 amostras de soro colhidas durante infecções agudas apresentaram anticorpos IgG detectáveis).

As seqüências mais freqüentes do bloco 2 encontradas em 23 episódios de malária aguda foram os tipos II e III, que são idênticos aos antígenos BR7-2 e BP39-2, respectivamente. Os sete indivíduos expostos ao tipo II do bloco 2 reconheceram o antígeno homólogo BR7-2, mas somente 2 de 8 indivíduos expostos ao tipo III do bloco 2 tinham anticorpos IgG detectáveis contra o antígeno homólogo BP39-2 (figura 20). Diferenças

comparáveis foram encontradas para os antígenos do bloco 6, as seqüências tipo I e VII do bloco 6 são idênticas aos antígenos BR7-6 e BP39-6 do bloco 6, mas somente 3 de 10 indivíduos expostos à seqüência tipo I tinham anticorpos IgG detectáveis contra o antígeno homólogo BR7-6, enquanto 4 de 5 indivíduos expostos à seqüência homóloga ao antígeno BP39-6 tinham anticorpos específicos (figura 21). Os antígenos BR7 e BP39 do bloco 10 correspondem às seqüências tipo V e IX do bloco 10, todos os indivíduos expostos a essas seqüências tinham anticorpos IgG contra o antígeno homólogo, mas eles normalmente reconheceram outra variante não relacionada (figura 22).

Id	T Am	Haplótipo	Belém	BR07	BP13	BP29	BP30	BP39
326	1	T0	---					
		T1	II					
		T2	III					
395	5	T0	---					
		T1	III					
463	9	T0	---					
		T1	II					
277	10	T0	---					
		T1	II					
413	10	T0	---					
		T1	III					
		T2	III					
419	10	T0	---					
		T1	I					
		T2	III					
373	13	T0	---					
		T1	III					
347	14	T0	---					
		T1	II					
520	15	T0	---					
		T1	V					
440	17	T0	---					
		T1	I					
141	18	T0	---					
		T1	III					
405	18	T0	---					
		T1	III					
312	19	T0	---					
		T1	I					
264	20	T0	---					
		T1	I					
122	23	T0	---					
		T1	I					
291	23	T0	---					
		T1	II					
271	27	T0	---					
		T1	I					
316	27	T0	---					
		T1	II					
380	43	T0	---					
		T1	III					
		T2	IV					

Figura 20- Anticorpos IgG contra variantes do bloco 2 da PvMSP-1 em amostras sequenciais de indivíduos expostos à malária. “Id” se refere à identificação numérica de cada indivíduo. “T Am” se refere ao tempo de residência na Amazônia (em anos), como medida de exposição cumulativa à malária. “Haplótipo” indica o tipo de sequência detectada durante infecção aguda de malária (numeradas como na figura 10 (bloco 2). Traços indicam a ausência de parasitos no momento da colheita de sangue. T0: amostras colhidas no *baseline*, na ausência de infecção por *P. vivax*; Outras amostras de soro (T1, T2 e T3) foram colhidas durante episódios incidentes de *P. vivax* que tiveram a variante da PvMSP-1 presente no parasito infectante caracterizada por sequenciamento de DNA. Os resultados sorológicos para infecções incidentes por *P. vivax* com o tipo de sequência da PvMSP-1 não determinado não são apresentados. Cada retângulo representa os níveis de anticorpos, em uma amostra individual, contra um determinado antígeno. A graduação de cor é proporcional à concentração de anticorpos IgG (IR). IRs entre 1,1 e 1,3 são representados em cinza claro e IRs acima de 1,3 são representados por cinza escuro. Resultados negativos são representados pela cor branca

Id	T Am	Haplótipo	Belém	BR07	BP01	BP39
326	1	T0	---			
		T1	I			
		T2	VII			
		T3	VII			
424	4	T0	---			
		T1	III			
443	4	T0	---			
		T1	I			
395	5	T0	---			
		T1	VIII			
267	8	T0	---			
		T1	I			
459	9	T0	---			
		T1	XIV + V			
463	9	T0	---			
		T1	I			
413	10	T0	---			
		T1	VII			
419	10	T0	---			
		T1	V			
		T2	VII			
373	13	T0	---			
		T1	II			
61	14	T0	---			
		T1	V			
347	14	T0	---			
		T1	I			
		T2	I			
418	14	T0	---			
		T1	I			
520	15	T0	---			
		T1	I			
		T2	V			
440	17	T0	---			
		T1	V			
141	18	T0	---			
		T1	VII			
405	18	T0	---			
		T1	IX + VIII			
264	20	T0	---			
		T1	V			
122	23	T0	---			
		T1	V			
291	23	T0	---			
		T1	I			
316	27	T0	---			
		T1	I			
380	43	T0	---			
		T1	I			
		T2	VIII			

Figura 21 Legenda: atrás

Figura 21- Anticorpos IgG contra variantes do bloco 6 da PvMSP-1 em amostras seqüenciais de indivíduos expostos à malária. “Id” se refere à identificação numérica de cada indivíduo. “T Am” se refere ao tempo de residência na Amazônia (em anos), como medida de exposição cumulativa à malária. “Haplótipo” indica o tipo de seqüência detectada durante infecção aguda de malária (numeradas como na figura 11 (bloco 6). Traços indicam a ausência de parasitos no momento da colheita de sangue. T0: amostras colhidas no *baseline*, na ausência de infecção por *P. vivax*; Outras amostras de soro (T1, T2 e T3) foram colhidas durante episódios incidentes de *P. vivax* que tiveram a variante da PvMSP-1 presente no parasito infectante caracterizada por seqüenciamento de DNA. Os resultados sorológicos para infecções incidentes por *P. vivax* com o tipo de seqüência da PvMSP-1 não determinado não são apresentados. Cada retângulo representa os níveis de anticorpos, em uma amostra individual, contra um determinado antígeno. A graduação de cor é proporcional à concentração de anticorpos IgG (IR). IRs entre 1,1 e 1,3 são representados em cinza claro e IRs acima de 1,3 são representados por cinza escuro. Resultados negativos são representados pela cor branca

Id	T Am	Haplótipo		BR07	BP01	BP13	BP29	BP39
326	1	T0	---					
		T1	V					
		T2	IX					
		T3	IX					
395	5	T0	---					
		T1	IX					
267	8	T0	---					
		T1	V					
463	9	T0	---					
		T1	V					
277	10	T0	---					
		T1	V					
413	10	T0	---					
		T1	IX					
		T2	IX					
419	10	T0	---					
		T1	II					
		T2	IX					
61	14	T0	---					
		T1	I					
347	14	T0	---					
		T1	V					
		T2	V					
418	14	T0	---					
		T1	V					
520	15	T0	---					
		T1	V					
		T2	V					
405	18	T0	---					
		T1	IX					
264	20	T0	---					
		T1	I					
122	23	T0	---					
		T1	I					
291	23	T0	---					
		T1	V					
271	27	T0	---					
		T1	I					
316	27	T0	---					
		T1	V					
		T2	V					
380	43	T0	---					
		T1	V					
		T2	XI					
		T3	IX					

Figura 22. Legenda: atrás

Figura 22- Anticorpos IgG contra variantes do bloco 10 da PvMSP-1 em amostras seqüenciais de indivíduos expostos à malária. “Id” se refere à identificação numérica de cada indivíduo. “T Am” se refere ao tempo de residência na Amazônia (em anos), como medida de exposição cumulativa à malária. “Haplótipo” indica o tipo de seqüência detectada durante infecção aguda de malária (numeradas como na figura 12 (bloco 10). Traços indicam a ausência de parasitos no momento da colheita de sangue. T0: amostras colhidas no *baseline*, na ausência de infecção por *P. vivax*; Outras amostras de soro (T1, T2 e T3) foram colhidas durante episódios incidentes de *P. vivax* que tiveram a variante da PvMSP-1 presente no parasito infectante caracterizada por seqüenciamento de DNA. Os resultados sorológicos para infecções incidentes por *P. vivax* com o tipo de seqüência da PvMSP-1 não determinado não são apresentados. Cada retângulo representa os níveis de anticorpos, em uma amostra individual, contra um determinado antígeno. A graduação de cor é proporcional à concentração de anticorpos IgG (IR). IRs entre 1,1 e 1,3 são representados em cinza claro e IRs acima de 1,3 são representados por cinza escuro. Resultados negativos são representados pela cor branca

As proporções de amostras de indivíduos com anticorpos IgM detectáveis que reconheceram no mínimo um antígeno recombinante de cada bloco variável foram baixas: 17.4% (4 de 23) para o bloco 2; 0 para o bloco 6 e 44,4% (12 de 27) para o bloco 10 (figura 23). Somente 5% (4 de 40) dos indivíduos testados apresentaram anticorpos IgM contra a PvMSP-1₁₉.

Os indivíduos com anticorpos IgM detectáveis para o bloco 2 que foram expostos às seqüências tipo I (83% de similaridade com BP30-2) reconheceram os antígenos BP13-2 e BP29-2 e os indivíduos expostos ao tipo II (BR7-2) reconheceram o antígeno homólogo. Para o bloco 10, os indivíduos com anticorpos IgM detectados foram expostos às seqüências tipo I (78% de similaridade com BP29-10), V (BR7-10) e IX (BP39-10). Das três exposições ao tipo I, apenas em uma das exposições houve resposta contra o antígeno BP29-10. Das treze exposições ao tipo V, seis responderam contra o antígeno BR7-10 e de oito exposições ao tipo IX, apenas uma apresentou resposta de IgM contra o antígeno BP39-10.

Figura 23- Anticorpos IgM contra variantes da PvMSP-1 em amostras seqüenciais de indivíduos expostos à malária. “Id” se refere à identificação numérica de cada indivíduo. “T Am” se refere ao tempo de residência na Amazônia (em anos), como medida de exposição cumulativa à malária. “Haplótipo” indica o tipo de seqüência detectada durante infecção aguda de malária (numeradas como nas figuras 10 (bloco 2), 11 (bloco 6) e 12 (bloco 10). Traços indicam a ausência de parasitos no momento da colheita de sangue. T0: amostras colhidas no *baseline*, na ausência de infecção por *P. vivax*; Outras amostras de soro (T1, T2 e T3) foram colhidas durante episódios incidentes de *P. vivax* que tiveram a variante da PvMSP-1 presente no parasito infectante caracterizada por seqüenciamento de DNA. Os resultados sorológicos para infecções incidentes por *P. vivax* com o tipo de seqüência da PvMSP-1 não determinado não são apresentados. Cada retângulo representa os níveis de anticorpos, em uma amostra individual, contra um determinado antígeno. A graduação de cor é proporcional à concentração de anticorpos IgG (IR). IRs entre 1,1 e 1,3 são representados em cinza claro e IRs acima de 1,3 são representados por cinza escuro. Resultados negativos são representados pela cor branca. **A:** dados relativos aos antígenos do bloco 2; **B:** dados relativos aos antígenos do bloco 6; **C:** dados relativos aos antígenos do bloco 10

V- DISCUSSÃO

Plasmodium vivax é responsável por aproximadamente 90% das infecções maláricas que ocorrem fora da África, sua extensa distribuição geográfica faz com que a malária causada por esta espécie seja considerada um grande problema de saúde pública em diversas partes do mundo, principalmente pelo fato de que nas últimas décadas têm-se registrado resistência de *P. vivax* às principais drogas antimaláricas e aumento no número de casos graves e mortes, o que antes era atribuído apenas a *Plasmodium falciparum*.

Em virtude das diferenças biológicas entre essas duas espécies, uma vacina contra *P. falciparum* com eficácia protetora de 50% resultaria em um índice de proteção à malária de apenas 20% em regiões onde *P. vivax* é altamente prevalente (Herrera et al., 2007). Em consequência de grande parte dos recursos serem destinados aos estudos de *P. falciparum*, atualmente o número de antígenos candidatos à vacina estudados é bem maior do que para *P. vivax*, além de as pesquisas estarem em estágios mais avançados. Estima-se que a redução ou eliminação de *P. falciparum* por vacinação eleve o número de casos de malária vivax, portanto, estudos sobre potenciais antígenos candidatos à vacina contra *P. vivax* são extremamente necessários.

A PvMSP-1 é uma das mais promissoras proteínas candidatas à vacina contra formas sangüíneas de *P. vivax*, mas um dos problemas críticos para o desenvolvimento de vacinas contra a malária baseadas na PvMSP1 é determinar se o alto polimorfismo de sequência induz imunidade variante-específica adquirida naturalmente e/ou imunidade induzida por vacina. A

noção de que imunidade protetora é direcionada principalmente contra domínios altamente polimórficos de antígenos do estágio sangüíneo foi recentemente corroborada com experimentos em camundongos que demonstraram que domínios variáveis da MSP1 de parasitos de malária de roedores estão sob forte pressão imune variante-específica induzida por infecções prévias (Martinelli et al., 2005). No entanto, a especificidade de anticorpos adquiridos naturalmente contra variantes da PvMSP1 permanece pouco estudada.

Neste trabalho, foi investigada a presença de anticorpos IgG e IgM contra um painel de proteínas recombinantes correspondentes aos blocos variáveis 2, 6 e 10 da PvMSP1 de parasitos comumente encontrados em área rural da Amazônia Brasileira. Apenas 30% dos indivíduos apresentaram anticorpos IgG contra pelo menos uma das variantes dos blocos 2, 6 e 10. Os mecanismos responsáveis pelo reconhecimento imune limitado de variantes antigênicas que sabidamente circulam numa dada área endêmica ainda não são claros; antígenos variáveis podem ser pouco imunogênicos ou podem induzir respostas de anticorpos de curta duração na ausência de estímulos freqüentes (Mercereau-Puijalon et al., 1991). Diferentemente dos antígenos que representam as regiões variáveis, o domínio conservado C-terminal (PvMSP1₁₉) foi reconhecido por mais de 50% da população estudada, confirmando que a região C-terminal é mais imunogênica do que a região N-terminal da PvMSP1 em infecções naturais, como descrito por Soares e colaboradores (1997a).

Os maiores níveis de anticorpos IgG contra os antígenos variáveis foram obtidos em pares de antígenos com seqüências de aminoácidos relativamente similares. Esse achado pode sugerir que uma proporção substancial de anticorpos IgG adquiridos naturalmente reconhecem as seqüências polimórficas dos antígenos recombinantes que representam os blocos 2, 6 e 10 da PvMSP1, ao invés de seqüências conservadas flangeadoras que são compartilhadas por todas as variantes do mesmo bloco.

A partir das diferenças observadas em relação às respostas de anticorpos IgG aos domínios variáveis e ao domínio conservado de 19 KDa da PvMSP1 em indivíduos expostos à malária, pode-se sugerir que a aquisição de resposta de anticorpos é determinada por diferentes fatores. As correlações significantes encontradas entre níveis de IgG e tempo de residência na Amazônia mostram que a exposição cumulativa à malária prediz a presença e os maiores níveis de anticorpos IgG contra no mínimo um domínio variável da PvMSP1, enquanto a exposição recente à malária foi um forte preditor da presença e de maiores níveis de anticorpos IgG à PvMSP1₁₉.

A presença de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra a ICB2-5 (um antígeno recombinante que compreende três blocos conservados (1, 3 e 5) e dois blocos variáveis (2 e 4) do alelo Belém da PvMSP1) foi recentemente associada com exposição cumulativa à malária e proteção à doença clínica, enquanto o reconhecimento do domínio conservado PvMSP1₁₉ não se associou nem com exposição cumulativa, nem com

imunidade clínica (Nogueira, et al., 2006). Essas diferenças podem ser importantes para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária, já que se espera que a exposição natural ao parasito re-estimele a resposta imune produzida pela imunização para manter a proteção a longo prazo. Embora haja dados convincentes que mostram que anticorpos contra a MSP1 podem conferir proteção contra a malária (Conway et al., 2000; O'Donnell et al., 2001), a relativa contribuição de diferentes alvos e mecanismos da proteção mediada por anticorpos permanece não esclarecida. O domínio conservado de 19 KDa da MSP1 de *P. falciparum* é o principal alvo de anticorpos adquiridos naturalmente que inibem o crescimento do parasito *in vitro* (O'Donnell et al., 2001) e reduz o risco de infecção subsequente (John et al., 2004), mas anticorpos variante-específicos ao domínio altamente polimórfico (bloco 2) da PfMSP1 também parecem fornecer proteção clínica (Conway et al., 2000).

Para determinar se a baixa frequência de reconhecimento de domínios variáveis da PvMSP1 resultou de uma falta de correspondência entre as seqüências dos antígenos recombinantes e aquelas atualmente encontradas em parasitos locais, os blocos 2, 6 e 10 do gene da MSP1 de isolados locais de *P. vivax* que circulavam antes (1999) e durante (2004-2005) o estudo foram seqüenciados. Dos 16 antígenos expressos como proteínas recombinantes, as seqüências de 10 deles foram encontradas nos parasitos locais, sugerindo que o painel de antígenos recombinantes utilizado na sorologia representa apropriadamente o repertório de variantes da PvMSP1 ao qual os indivíduos foram expostos antes e durante o estudo. Portanto, a

baixa freqüência de reconhecimento dos antígenos dos blocos variáveis não pode ser atribuída ao fato de os indivíduos raramente serem expostos a essas variantes ou variantes similares.

Entretanto, não foi encontrada nenhuma associação evidente entre a presença de uma dada seqüência em 1999 ou 2004-5 e a proporção de respondedores para o antígeno recombinante correspondente no *baseline*. Por exemplo, a versão BP1 do bloco 6 foi a variante mais reconhecida no *baseline* (24,2% dos indivíduos tinham anticorpos IgG detectáveis), mas a sua seqüência não foi encontrada nos parasitos circulantes em 1999 ou 2004-2005, sendo que o tipo de seqüência com maior similaridade a BP1-6 (tipo XII, 98,1% de identidade de aminoácidos), foi detectado em apenas um dos 19 parasitos analisados em 1999 e em nenhum dos 50 parasitos analisados em 2004-2005. Também, a seqüência tipo III do bloco 2 foi a variante mais encontrada tanto em 1999 como em 2004-2005, mas foi reconhecida por anticorpos IgG de apenas 15,7% dos indivíduos analisados no *baseline* (o antígeno recombinante correspondente é BP39. Aliás, todos antígenos do bloco 2 foram reconhecidos por proporções semelhantes de indivíduos a despeito da relativa abundância de seqüências correspondentes nos parasitos locais.

A análise da resposta de anticorpos dos indivíduos realizada durante episódios de malária por *P. vivax* mostrou um aumento substancial na proporção de respondedores aos antígenos que representam os blocos variáveis 2, 6 e 10 da PvMSP1, o que sugere que a baixa proporção de respondedores detectada no início do estudo quando a infecção por *P. vivax*

não estava presente não pode ser atribuída à baixa imunogenicidade dos domínios variáveis. No entanto, os anticorpos induzidos durante as infecções agudas não são necessariamente variante-específicos, já que eles não são correspondentes à variante da PvMSP1 encontrada no parasito infectante, e reconhecem outras variantes não relacionadas estruturalmente.

Esses resultados indicam que a baixa imunogenicidade dos antígenos variáveis pode não representar o principal obstáculo na aquisição de imunidade variante-específica. A falta de correspondência entre anticorpos e antígenos também já foi observada em anticorpos contra a MSP1 de *Plasmodium falciparum* (da Silveira et al., 1999; Scopel, 2005) e pode ser explicada por quatro hipóteses.

A primeira hipótese diz respeito à presença de variantes da PvMSP1 em parasitos infectantes que foram perdidas durante o procedimento de tipagem. Esta hipótese foi sugerida para explicar a semelhante falta de correspondência na especificidade de anticorpos em infecções por *P. falciparum*, já que esses parasitos levam consigo algumas variantes antigênicas que podem ser perdidas pelo procedimento de tipagem (chamados de genótipos escondidos, “hidden genotypes”) por eles estarem seqüestrados em órgãos profundos ou na placenta no momento da colheita do sangue. Como foi realizado seqüenciamento direto de DNA de produtos de PCR para analisar as variantes da PvMSP1 de parasitos circulantes e seqüestro em órgãos profundos não ocorre em infecções por *P. vivax*, é improvável que variantes perdidas possam ter interferido nos resultados.

Outra hipótese que poderia explicar a falta de correspondência é a de indução de resposta de anticorpos restrita a anticorpos da classe IgM ao mesmo domínio da PvMSP1 (Mertens, 1993), porém a análise das respostas individuais de anticorpos IgG e IgM contra as regiões variáveis, faz com que esta hipótese deixe de ser plausível, pois quase todos os indivíduos infectados por *P. vivax* que não produziram anticorpos IgG contra antígenos homólogos, também não produziram anticorpos IgM específicos para os mesmos antígenos.

A hipótese de *clonal imprinting* ou pecado antigênico original seria a terceira tentativa de explicar a falta de correspondência entre anticorpos e antígenos. Esta hipótese sugere que a falta de correspondência se origina do fato de que infecções sucessivas com diferentes variantes podem re-estimar a resposta de anticorpos pré-existentes em vez de gerar anticorpos com novas especificidades. No entanto, a partir da análise das amostras não foram encontradas evidências de anticorpos com especificidade fixa a alguma variante da PvMSP1 que tenha sido detectada em amostras seqüenciais de soro, como seria esperado na hipótese de *clonal imprinting* (Taylor et al., 1996).

A quarta hipótese pode justificar a falta de correspondência pela presença de anticorpos IgG induzidos por infecções recentes com outras variantes da PvMSP1 que não foram detectadas. De fato, a maioria dos casos em que a resposta de anticorpos não é correspondente ao antígeno presente na infecção não resulta da persistência de anticorpos heterólogos pré-existentes, mas sim de soroconversão a antígenos heterólogos que

supostamente ocorreram entre duas colheitas de sangue subseqüentes. Portanto, parece mais sensato atribuir as freqüentes não-correspondências entre as variantes da PvMSP1 encontradas em parasitos infectantes e as variantes reconhecidas por anticorpos IgG às infecções não detectadas com outras variantes que ocorreram entre o início do estudo e a subseqüente colheita de sangue.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que anticorpos contra o repertório local de domínios variáveis da PvMSP1 são induzidos depois de algumas infecções repetidas e requerem re-estímulos freqüentes, enquanto os anticorpos contra a PvMSP1₁₉ são mais frequentemente detectados em indivíduos não infectados, possivelmente em razão de sua meia-vida maior.

Este trabalho é o primeiro a descrever a resposta de anticorpos variante-específicos contra variantes dos blocos 2, 6 e 10 da PvMSP1 adquiridos naturalmente na região da Amazônia rural brasileira.

VI- CONCLUSÕES

1. As regiões variáveis da PvMSP-1 foram menos reconhecidas por anticorpos IgG de indivíduos naturalmente expostos à malária que a região conservada C-terminal PvMSP-1₁₉.
2. Exposição recente à malária foi um forte preditor da presença de anticorpos IgG contra a PvMSP-1₁₉ e exposição cumulativa à malária foi um forte preditor de anticorpos IgG contra as regiões variáveis da PvMSP-1
3. As proteínas recombinantes das regiões variáveis da PvMSP-1 utilizadas no estudo representaram apropriadamente as seqüências encontradas em parasitas que circulavam na região antes e durante o estudo
4. A diversidade de seqüências de aminoácidos dos antígenos da região da PvMSP-1 interferiu no reconhecimento por anticorpos, visto que maiores coeficientes de correlação foram observados entre os níveis de anticorpos IgG contra antígenos de maior de similaridade
5. A freqüência e os níveis de anticorpos IgG contra os antígenos variáveis da PvMSP-1 aumentaram durante o episódio de malária mas a resposta não correspondem necessariamente à variante encontrada no parasita infectante e os anticorpos reconheceram outras variantes não relacionadas estruturalmente.
6. Os dados obtidos sugerem que anticorpos contra o repertório local de domínios variáveis da PvMSP-1 são induzidos depois de algumas infecções repetidas e requerem re-estímulos freqüentes.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Aquisição de imunidade contra *Plasmodium vivax*: estudo longitudinal em uma comunidade rural da Amazônia brasileira”

Eu, _____, com _____ anos de idade, fui contatado por um membro ou representante da equipe de pesquisa coordenada pelo professor Dr. Marcelo Urbano Ferreira, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e solicitado a doar uma pequena quantidade do meu sangue para utilização nos estudos preliminares do projeto de pesquisa sobre imunologia da malária citado acima. Fui informado que este projeto pretende investigar como as pessoas que vivem em áreas onde malária é transmitida criam resistência à doença, e para tanto os pesquisadores necessitam de 5 ml de sangue venoso de alguns pacientes, que será colhido através de punção venosa asséptica. Fui esclarecido que sentirei o equivalente a uma “picada de injeção na veia”, e que os riscos deste procedimento são mínimos, em nada alterando o meu tratamento para malária. Fui esclarecido também que a minha participação voluntária é muito importante para o estudo desenvolvido pelos pesquisadores, e se limitará a uma única coleta de sangue de no máximo 5 ml. Finalmente, fui informado que as informações sobre a minha pessoa e a minha participação no estudo serão mantidas em sigilo.

Considero-me satisfeito com as explicações fornecidas e concordo em participar como voluntário (a) deste estudo.

São Paulo, _____ de _____ de 200 .

Nome: _____

Assinatura : _____

Marcelo Urbano Ferreira ou membro da equipe

(Documento em duas vias, 01 para o voluntário, 01 para o pesquisador)

Endereço para contato:

Depto de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av Prof Lineu Prestes, 1374 – Cidade Universitária – SP – SP
Cep 05508-900 – Fone: 11-3091-7273

FICHA CLÍNICA

PACIENTE Nº _____

1. Nome:

2. Idade

3. Data do início dos sintomas: ____/____/____

4. Data do início do tratamento: ____/____/____

5. Tratamento (qual?):

6. Data da LVC: ____/____/____

7. Já teve malária antes? Sim _____ Não _____

Quando?

Qual tipo?

Numero de tubos coletados:

Densidade óptica (média) e *cut-off* do ELISA para pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM contra os blocos variáveis 2, 6 e 10 e da região C-terminal (MSP1₁₉) da proteína de superfície do merozoíto de *P. vivax* (PvMSP1)

Antígeno	anticorpos IgG			anticorpos IgM		
	DO* (média)	DP**	Cut-off	DO (média)	DP	Cut-off
Belém-2	0,106	0,082	0,271	0,090	0,091	0,363
BR7-2	0,108	0,103	0,314	0,064	0,058	0,238
BP13-2	0,186	0,137	0,460	0,042	0,045	0,177
BP29-2	0,060	0,078	0,216	0,022	0,040	0,141
BP30-2	0,082	0,096	0,273	0,285	0,197	0,877
BP39-2	0,077	0,068	0,213	0,154	0,171	0,667
Belém-6	0,061	0,081	0,222	0,004	0,009	0,032
BR07-6	0,097	0,086	0,269	0,072	0,090	0,342
BP1-6	0,039	0,041	0,122	0,007	0,023	0,076
BP39-6	0,116	0,097	0,311	0,125	0,130	0,516
BR07-10	0,013	0,020	0,053	0,044	0,060	0,223
BP1-10	0,005	0,009	0,022	0,019	0,040	0,138
BP13-10	0,033	0,087	0,207	0,036	0,050	0,185
BP29-10	0,041	0,078	0,197	0,080	0,086	0,338
BP39-10	0,018	0,028	0,073	0,048	0,082	0,295
PvMSP1 ₁₉	0,020	0,030	0,079	0,022	0,027	0,103

*DO= densidade óptica

**DP= desvio padrão

Resultados do ELISA para a determinação de anticorpos IgG e IgM contra os diferentes antígenos recombinantes dos blocos variáveis 2, 6 e 10 da e da região conservada C-terminal (PvMSP1₁₉) da proteína de superfície do merozoíta (MSP1) de *P. vivax*. Os resultados são expressos em medianas dos índices de reatividade (IR) das 376 amostras de soro de indivíduos residentes em área endêmica de malária.

Antígenos recombinantes da MSP1 de <i>P. Vivax</i>		Resultados ELISA		
		IgG	IgM	
		IR (25% - 75%)	IR (25% - 75%)	
Regiões variáveis da PvMSP-1	bloco 2	Belém-2	0,229 (0,007-0,564)	0,253 (0,053-0,521)
		BR7-2	0,321 (0,138-0,579)	0,148 (0,006-0,475)
		BP13-2	0,401 (0,226-0,648)	0,156 (0,007-0,357)
		BP29-2	0,296 (0,016-0,682)	0,011 (0,008-0,234)
		BP30-2	0,298 (0,033-0,560)	0,157 (0,071-0,250)
		BP39-2	0,400 (0,131-0,712)	0,186 (0,021-0,347)
	bloco 6	Belém-6	0,088 (0,005-0,437)	0,042 (0,037-0,347)
		BR7-6	0,227 (0,017-0,483)	0,079 (0,008-0,419)
		BP1-6	0,407 (0,014-0,943)	0,015 (0,013-0,044)
		BP39-6	0,260 (0,047-0,493)	0,012 (0,002-0,218)
	bloco 10	BR7-10	0,022 (0,016-0,077)	0,107 (0,005-0,322)
		BP1-10	0,048 (0,039-0,074)	0,012 (0,008-0,355)
		BP13-10	0,006 (0,004-0,024)	0,111 (0,007-0,403)
		BP29-10	0,149 (0,006- 0,484)	0,262 (0,087-0,487)
		BP39-10	0,016 (0,010-0,353)	0,174 (0,015-0,367)
	C-terminal	bloco 13 PvMSP1 ₁₉	1,301 (0,017-5,286)	0,014 (0,011-0,189)

IR= DO da amostra/ DO do "cut-off"

Resultados em IR do ELISA das 376 amostras de soro de indivíduos residentes em área endêmica de malária para a determinação de anticorpos IgG contra os diferentes antígenos recombinantes dos blocos variáveis 2, 6 e 10 e da região conservada C-terminal (PvMSP1₁₉) da proteína de superfície do merozoíta (MSP1) de *P. vivax*.

Soro	Belém-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Belém-6	BR7-6
1	0,005	0,004	0,287	0,006	0,010	0,069	0,005	0,593
2	0,401	0,425	0,530	0,006	0,010	0,005	0,005	0,004
3	0,005	0,004	0,002	0,007	0,010	0,006	0,006	0,004
6	1,114	0,129	0,085	0,006	0,009	1,382	0,005	0,049
7	0,418	0,253	0,308	0,188	0,212	0,108	0,712	0,864
8	1,241	0,139	0,201	0,006	0,009	1,211	0,006	0,004
9	0,739	0,546	0,325	0,635	0,681	0,567	0,157	0,273
10	1,019	0,912	0,573	0,767	0,399	0,612	0,318	0,458
11	1,421	1,390	0,922	1,675	1,268	1,480	0,966	0,659
13	0,867	0,563	0,543	0,893	0,810	0,796	0,872	0,755
14	1,246	0,775	0,687	0,462	0,992	0,792	0,434	0,769
15	0,606	0,498	0,416	0,488	0,564	0,504	0,519	0,574
16	0,319	0,313	0,475	0,202	0,622	0,661	1,036	0,311
17	0,294	0,306	0,287	0,142	0,161	0,241	0,005	0,107
18	0,676	0,654	0,291	0,272	0,460	0,430	0,255	0,392
19	0,315	0,439	0,449	0,623	0,968	0,600	0,609	0,469
20	0,232	0,235	0,232	0,006	0,008	0,098	0,005	0,414
21	0,267	0,481	0,597	0,548	0,548	0,453	3,503	2,976
23	0,004	0,229	0,181	0,006	0,008	0,033	0,210	0,458
24	0,674	0,775	0,730	0,716	1,097	0,752	0,920	2,060
25	0,586	0,765	0,623	0,999	0,883	0,794	0,673	0,520
26	0,008	0,281	0,279	0,345	0,010	0,080	0,005	0,004
27	0,228	0,284	0,361	0,138	0,188	0,150	0,083	0,103
32	0,441	0,559	0,530	0,551	0,325	0,357	0,157	0,214
33	0,394	0,192	0,228	0,482	0,291	0,009	0,290	0,280
35	0,603	0,413	0,378	0,345	0,299	0,268	0,211	0,317
36	0,886	0,915	0,946	1,058	1,233	1,325	0,128	0,199
37	0,366	0,357	0,597	0,309	0,601	0,342	0,097	0,225
38	0,936	0,718	0,551	0,664	1,096	0,689	0,369	0,394
39	0,212	0,004	0,131	0,006	0,126	0,005	0,005	0,038
40	0,857	0,787	0,786	0,855	0,411	0,594	0,031	0,250
41	0,121	0,004	0,151	0,068	0,084	0,005	0,005	0,119
43	0,004	0,138	0,225	0,005	0,007	0,005	0,005	0,075
44	0,568	0,237	0,472	0,190	0,651	0,478	0,154	0,257
45	0,131	0,376	0,398	0,116	0,000	0,057	0,005	0,193
47	0,703	0,525	0,577	0,538	1,322	0,639	0,547	0,482
50	0,397	0,887	0,391	0,190	0,007	0,681	0,085	1,095
52	0,011	0,229	0,247	0,312	0,007	0,224	0,005	0,752
53	0,007	0,203	0,186	0,161	0,049	0,151	0,004	0,350
54	0,154	0,216	0,290	0,115	0,007	0,086	0,004	0,905
55	0,004	0,074	0,322	0,151	0,423	0,388	0,432	0,544
56	0,004	0,003	0,004	0,006	0,010	0,035	0,005	0,032
57	0,143	0,103	0,346	0,169	0,010	0,079	0,005	0,197
58	0,004	0,077	0,191	0,006	0,010	0,049	0,005	0,014
59	0,063	0,067	0,131	0,006	0,010	0,010	0,005	0,004
60	0,254	0,184	0,911	0,124	0,177	0,267	0,019	0,113
61	0,298	0,237	0,683	0,214	0,354	0,303	0,075	0,210
62	0,149	0,578	0,789	1,110	1,088	0,836	0,515	0,530
63	0,256	0,387	0,565	0,435	0,301	0,421	0,178	0,334
64	0,005	0,115	0,271	0,149	0,009	0,092	0,061	0,145

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
1	0,009	0,200	0,679	0,227	0,604	0,858	1,986	0,398
2	0,009	0,004	0,021	0,051	0,005	0,178	0,356	4,236
3	0,009	0,004	0,020	0,049	0,000	0,005	0,014	0,016
6	6,045	0,004	0,020	0,049	0,043	1,299	0,740	11,330
7	4,452	0,604	7,264	0,049	3,478	4,360	9,945	4,421
8	0,009	0,038	0,022	0,054	0,005	0,005	0,014	0,015
9	0,495	0,185	0,022	0,054	0,005	0,005	0,015	0,000
10	0,942	0,335	0,020	0,051	0,005	0,025	0,014	2,148
11	1,314	0,546	0,020	0,050	0,005	0,482	0,589	3,050
13	1,038	0,476	0,020	0,051	0,005	0,005	0,015	0,953
14	1,004	0,635	2,132	2,045	0,657	1,036	1,548	2,313
15	0,777	0,316	1,547	1,818	0,314	0,827	1,384	3,381
16	1,370	0,467	2,528	7,455	1,401	1,091	4,384	1,175
17	0,111	0,190	0,849	0,046	0,116	0,396	0,466	1,424
18	0,760	0,536	1,830	2,364	0,420	0,721	1,945	2,101
19	0,641	0,353	0,019	3,818	0,676	1,020	3,288	1,037
20	0,228	0,201	1,453	1,500	0,444	0,848	1,411	0,185
21	1,660	2,501	0,792	0,818	0,729	1,543	7,466	13,137
23	0,944	0,433	0,018	0,053	0,013	0,326	0,010	1,333
24	0,626	1,089	0,082	1,580	0,013	0,535	0,691	2,178
25	0,614	0,527	0,740	3,446	0,382	0,361	1,177	9,823
26	0,009	0,004	0,019	0,058	0,014	0,305	0,011	3,793
27	0,071	0,076	0,017	0,051	0,013	0,005	0,010	2,307
32	0,124	0,159	0,740	0,049	0,051	0,473	0,126	0,255
33	0,124	0,278	0,018	0,050	0,014	0,270	0,263	0,014
35	0,178	0,322	0,016	0,051	0,318	0,127	0,078	0,325
36	0,500	0,316	0,017	0,051	0,013	0,183	0,010	0,014
37	0,457	0,551	0,362	0,031	0,055	0,239	0,009	0,014
38	0,147	0,458	0,006	0,033	0,003	0,214	0,009	0,014
39	0,009	0,089	0,049	0,032	0,003	0,582	0,009	0,015
40	0,785	0,154	0,254	0,032	0,003	1,161	0,009	14,776
41	0,009	0,042	0,518	0,030	0,003	0,157	0,009	0,014
43	0,008	0,129	0,680	0,031	0,003	0,411	0,009	0,014
44	0,090	0,253	0,826	1,184	0,003	0,354	0,009	1,128
45	0,008	0,004	0,005	0,032	0,003	0,004	0,010	0,771
47	0,556	0,452	0,020	0,048	0,005	0,005	0,014	0,963
50	0,337	0,509	0,020	0,053	0,357	0,721	0,014	5,101
52	0,580	0,435	0,020	0,051	0,005	0,005	0,014	0,682
53	0,227	0,173	0,020	0,050	0,005	0,071	0,014	7,567
54	0,205	0,177	0,019	0,050	0,005	0,954	0,014	14,622
55	0,279	0,545	0,025	0,059	0,006	0,006	0,016	4,459
56	0,561	0,156	0,021	0,052	0,889	0,320	0,014	11,021
57	0,115	0,130	0,020	0,050	0,005	0,005	0,015	0,225
58	0,008	0,068	0,189	0,048	0,005	0,005	0,014	0,013
59	0,008	0,052	0,021	0,169	0,005	0,006	0,259	0,264
60	0,008	0,198	0,024	0,196	0,006	0,007	0,010	0,014
61	0,253	0,144	0,022	0,178	0,006	0,007	0,010	0,014
62	1,355	0,562	0,027	0,210	0,007	0,008	0,010	1,352
63	0,749	0,314	0,021	0,172	0,005	0,006	0,009	0,284
64	0,000	0,014	0,021	0,169	0,005	0,007	0,009	0,014

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
65	0,219	0,348	0,518	0,396	0,301	0,354	0,374	0,381
66	0,172	0,259	0,238	0,067	0,007	0,005	0,004	0,014
67	0,230	0,412	0,406	0,412	0,007	0,171	0,039	0,159
68	0,426	0,259	0,602	0,515	0,284	0,316	0,163	0,374
69	0,130	0,109	0,393	0,006	0,007	0,005	0,004	0,069
70	0,175	0,003	0,417	0,006	0,007	0,005	0,004	0,004
71	0,244	0,233	0,270	0,006	0,007	0,004	0,004	0,035
72	0,335	0,003	0,156	0,237	0,005	0,192	0,298	1,273
74	0,004	0,361	0,536	0,665	0,005	0,407	0,005	0,004
76	0,183	0,170	0,588	0,082	0,005	0,018	0,149	0,217
77	0,007	0,370	0,414	0,778	0,005	0,384	0,115	0,003
78	0,004	0,290	0,401	0,752	0,529	0,594	0,498	0,328
80	0,443	0,478	0,332	0,410	0,162	0,265	0,292	0,608
81	1,114	1,248	0,928	1,250	1,062	1,370	1,379	1,284
82	1,071	0,580	0,567	0,540	0,587	0,651	0,490	0,365
83	1,279	1,197	0,883	1,084	0,361	0,988	0,064	0,136
84	0,863	0,526	0,562	0,738	0,535	0,818	0,589	0,590
85	0,413	0,287	0,111	0,190	0,070	0,169	0,122	0,480
86	0,369	0,089	0,374	0,148	0,333	0,300	0,293	0,331
88	0,734	0,299	0,467	0,255	0,238	0,268	0,333	0,955
89	0,520	0,248	0,213	0,069	0,070	0,244	0,122	0,532
90	0,159	0,127	0,276	0,269	0,432	0,502	0,446	0,483
91	0,244	0,138	0,286	0,073	0,059	0,306	1,080	0,455
92	0,563	0,359	0,483	0,272	0,303	0,504	0,301	0,311
93	1,311	0,570	0,354	0,417	0,400	1,140	0,526	0,285
94	0,364	0,307	0,369	0,190	0,166	0,749	0,330	0,463
95	0,364	0,166	0,507	0,005	0,107	0,217	0,057	0,238
96	0,276	0,082	0,098	0,005	0,123	0,249	0,166	0,317
97	0,987	0,297	0,346	0,184	0,299	0,427	0,640	0,878
98	0,820	0,325	0,469	0,283	0,190	0,319	0,289	0,377
99	0,772	0,506	0,516	0,447	0,272	0,516	0,166	0,320
100	0,228	0,164	0,254	0,060	0,243	0,511	0,337	0,283
102	0,004	0,154	0,479	0,005	0,015	0,127	0,138	0,000
103	0,004	0,105	0,251	0,006	0,006	0,116	0,090	0,061
104	0,176	0,417	0,460	0,267	0,366	0,585	0,255	0,385
107	0,268	0,302	0,395	0,006	0,007	0,212	0,030	0,332
108	0,352	0,480	0,589	0,203	0,006	0,267	0,200	0,186
109	0,050	0,452	0,647	0,168	0,006	0,156	0,005	0,004
110	0,304	0,592	0,437	0,429	0,020	0,425	0,010	0,066
111	0,510	0,714	0,737	1,010	0,737	0,709	0,773	0,782
112	0,466	0,602	0,667	0,587	0,380	0,490	0,525	0,498
113	0,217	0,305	0,333	0,429	0,320	0,445	0,586	0,424
114	0,676	0,627	0,489	0,396	0,417	0,819	0,454	0,580
115	0,263	0,560	0,147	0,004	0,003	0,005	0,004	0,003
118	1,781	2,476	1,211	2,472	0,265	2,105	0,392	0,496
119	0,393	0,662	0,422	0,621	0,286	0,537	0,837	0,527
120	0,105	0,322	0,222	0,357	0,166	0,273	0,280	0,148
121	0,452	0,585	0,375	0,600	0,438	0,439	0,647	0,388
122	1,453	1,357	1,119	1,587	0,276	1,675	0,262	0,243
124	0,004	0,551	0,547	0,557	0,525	0,170	0,608	0,552
125	0,197	0,298	0,584	0,228	0,391	0,340	0,552	0,407
126	0,551	0,273	0,297	0,356	0,430	0,350	0,552	0,301
129	0,282	0,568	0,755	0,679	0,312	0,578	0,428	0,431
130	0,159	0,562	0,560	0,529	0,186	0,840	0,265	0,579
131	0,003	0,100	0,391	0,005	0,008	0,203	0,004	0,261
132	0,269	0,416	0,354	0,005	0,009	0,357	0,004	0,003
133	0,004	0,034	0,073	0,005	0,009	0,033	0,004	0,003

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
65	0,370	0,328	0,022	0,174	0,006	0,007	0,010	0,500
66	0,008	0,003	0,023	0,182	0,006	0,007	0,010	2,534
67	0,033	0,057	0,022	0,173	0,006	0,007	0,009	2,763
68	0,739	0,471	0,020	0,098	0,005	0,431	0,009	0,790
69	0,008	0,003	0,021	0,103	0,005	0,006	0,010	0,013
70	0,008	0,341	0,026	0,113	0,006	0,006	0,009	0,013
71	0,361	0,226	0,022	0,104	0,006	0,006	0,010	0,560
72	0,007	0,201	0,023	0,107	0,006	0,006	0,010	0,014
74	0,376	0,003	0,028	0,132	0,007	0,007	0,013	0,439
76	0,590	0,366	0,022	0,110	0,006	0,241	0,009	3,064
77	0,008	0,066	0,022	0,103	0,006	0,006	0,010	0,013
78	0,302	0,384	0,026	0,122	0,007	0,007	0,010	0,427
80	0,534	0,563	0,043	0,068	0,007	0,004	0,009	0,740
81	2,137	0,932	0,044	0,065	0,130	0,004	0,507	3,400
82	0,496	0,560	0,039	0,064	0,006	0,046	0,008	0,539
83	0,397	0,215	0,042	0,065	0,007	0,004	0,008	0,815
84	0,977	0,551	0,043	0,062	0,007	0,004	0,008	3,512
85	0,082	0,219	0,041	0,063	0,007	0,004	0,008	0,013
86	0,008	0,418	0,048	0,070	0,007	0,004	0,009	0,139
88	0,238	0,550	0,044	0,067	0,007	0,004	0,008	3,139
89	0,115	0,357	0,045	0,068	0,007	0,356	0,008	4,063
90	0,303	0,389	0,022	0,050	0,005	0,096	0,669	1,418
91	0,329	0,307	0,023	0,055	0,005	0,004	0,010	0,013
92	0,233	0,291	0,021	0,054	0,005	0,004	0,009	0,845
93	0,562	0,304	0,022	0,054	0,005	0,004	0,010	5,283
94	1,703	0,343	0,020	0,052	0,005	0,949	0,009	15,306
95	0,434	0,320	0,020	0,052	0,005	0,042	0,009	0,429
96	0,407	0,565	0,020	0,052	0,005	0,731	0,009	14,121
97	0,342	0,495	0,020	0,050	0,005	0,306	0,401	3,550
98	0,618	0,409	0,023	0,058	0,005	0,004	0,011	3,781
99	0,008	0,284	0,026	0,046	0,003	0,004	0,011	0,322
100	0,008	0,249	0,024	0,043	0,003	0,003	0,010	0,077
102	0,008	0,192	0,028	0,051	0,004	0,004	0,012	0,014
103	0,009	0,134	0,026	0,048	0,004	0,004	0,011	0,015
104	0,822	0,716	0,023	0,044	0,003	0,003	0,010	0,799
107	1,436	0,712	0,026	0,049	0,003	0,003	0,010	0,743
108	0,524	0,414	0,026	0,048	0,004	0,003	0,011	0,392
109	0,009	0,265	0,029	0,053	0,004	0,004	0,012	0,322
110	0,069	0,205	0,024	0,046	0,004	0,003	0,011	0,014
111	1,433	0,482	0,492	0,045	0,009	0,134	0,082	1,346
112	0,910	0,554	0,011	0,047	0,009	0,006	0,031	1,053
113	1,141	0,590	0,612	0,046	0,009	0,006	0,029	3,052
114	2,609	1,004	2,228	0,041	0,632	1,315	1,821	1,639
115	0,223	0,003	0,011	0,050	0,010	0,006	0,032	0,746
118	1,378	0,641	0,010	0,047	0,083	0,006	0,030	12,286
119	0,891	0,510	0,120	0,048	0,010	0,006	0,030	1,671
120	0,257	0,244	0,090	0,045	0,009	1,175	0,030	16,350
121	0,139	0,414	0,010	0,045	0,009	0,006	0,030	14,656
122	0,008	0,176	1,975	0,059	0,191	0,340	0,565	5,468
124	0,805	0,439	1,039	0,064	0,005	0,090	0,017	1,636
125	0,888	0,497	2,206	1,602	0,295	1,738	1,389	1,836
126	0,332	0,385	1,490	0,060	0,005	1,384	0,694	0,705
129	0,373	0,348	1,432	0,060	0,005	0,265	0,016	0,545
130	0,696	0,455	1,455	0,061	0,005	0,245	0,016	0,011
131	1,165	0,495	1,998	0,059	0,114	0,654	0,404	0,011
132	0,007	0,076	1,109	0,062	0,005	0,475	0,017	0,012
133	0,007	0,190	0,820	0,063	0,005	0,315	0,017	0,112

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
134	0,535	0,707	0,329	0,894	0,132	0,796	0,297	0,301
135	1,079	0,986	0,918	1,331	0,009	0,899	0,004	0,172
136	0,664	0,782	0,605	0,583	0,122	1,057	0,143	0,334
137	0,780	0,462	0,334	0,341	0,227	0,509	0,306	0,701
138	0,477	0,258	0,102	0,228	0,003	0,496	0,042	0,908
139	0,455	0,414	0,147	0,331	0,003	0,473	0,003	0,530
140	0,135	0,192	0,203	0,095	0,003	0,310	0,003	0,878
141	0,003	0,003	0,103	0,004	0,003	0,028	0,026	0,210
142	0,361	0,651	0,348	0,573	0,308	0,596	0,381	0,438
143	0,392	0,220	0,351	0,000	0,364	0,238	0,116	0,239
144	0,280	0,185	0,267	0,004	0,003	0,071	0,003	0,133
145	1,254	1,602	1,214	1,031	0,118	1,235	0,029	0,230
146	0,508	0,410	0,513	0,193	0,147	0,256	0,318	0,211
147	0,135	0,228	0,253	0,061	0,006	0,163	0,034	0,150
148	0,037	0,285	0,305	0,066	0,007	0,093	0,008	0,196
149	0,272	0,421	0,583	0,066	0,007	0,023	0,004	0,003
150	0,896	1,362	1,357	1,582	0,007	0,928	0,004	0,003
152	0,022	0,120	0,234	0,266	0,004	0,141	0,004	0,191
153	0,226	0,413	0,377	0,014	0,004	0,137	0,004	0,580
156	0,226	0,447	0,448	0,793	0,701	0,438	0,650	1,020
157	0,418	0,634	0,465	0,669	0,415	0,692	0,506	0,586
158	0,003	0,245	0,294	0,004	0,109	0,110	0,179	0,003
159	0,003	0,128	0,078	0,004	0,004	0,252	0,004	0,242
161	0,275	0,492	0,356	0,439	0,375	0,442	0,252	0,354
162	0,009	0,142	0,268	0,019	0,004	0,031	0,004	0,003
163	0,291	0,919	0,340	0,512	0,518	0,500	0,544	0,487
164	0,003	0,642	0,425	0,743	0,467	0,868	0,473	0,478
165	0,485	0,592	0,417	0,112	0,004	0,004	0,004	0,065
166	0,166	0,532	0,363	0,340	0,121	0,371	0,137	0,175
167	0,835	0,862	0,628	0,754	0,117	0,618	0,184	0,554
168	0,669	0,407	0,402	0,162	0,004	2,052	0,027	0,204
169	0,003	0,003	0,326	0,004	0,004	0,004	0,004	0,003
170	1,216	1,704	1,151	1,765	0,300	1,532	0,289	0,369
172	0,494	0,713	0,867	0,543	0,451	0,974	0,524	0,998
173	0,728	0,553	0,415	0,516	0,560	0,639	0,644	0,571
174	0,342	0,524	0,418	0,535	0,416	0,427	0,428	0,406
178	0,583	0,470	0,572	0,285	0,339	0,500	0,262	0,284
179	0,157	0,224	0,342	0,005	0,004	0,004	0,004	0,403
180	0,199	0,578	0,509	0,600	0,497	0,629	0,352	0,395
181	0,806	0,975	0,985	1,101	0,569	0,884	0,367	0,464
182	0,587	0,541	0,422	0,434	0,389	0,645	0,375	0,444
183	0,359	0,595	0,566	0,748	0,457	0,689	0,386	0,807
184	0,289	0,319	0,256	0,256	0,006	0,138	0,004	0,345
185	0,404	0,309	0,362	0,581	0,243	0,242	0,004	0,150
186	0,253	0,354	0,547	0,522	0,006	0,269	0,004	0,400
187	0,273	0,172	0,145	0,015	0,006	0,184	0,004	1,157
188	0,157	0,177	0,698	2,254	0,006	0,050	0,004	0,610
189	0,350	0,145	0,135	0,005	0,006	0,027	0,220	0,986
190	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,005	0,005	0,004
191	0,004	0,003	0,003	0,004	0,004	0,005	0,005	0,004
192	0,004	0,003	0,003	0,003	0,004	0,005	0,005	0,005
193	0,004	0,003	0,003	0,003	0,004	0,004	0,005	0,004
196	0,004	0,003	0,003	0,003	0,004	0,005	0,006	0,004
197	0,004	0,126	0,083	0,003	0,003	0,004	0,005	0,004
198	0,025	0,137	1,642	1,060	0,273	0,137	0,007	0,313
199	0,004	0,059	0,550	0,020	0,006	0,147	0,007	0,005
200	0,004	0,248	1,728	0,056	1,412	0,544	0,006	0,092

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
134	0,629	0,753	0,013	0,050	0,005	0,005	0,012	4,013
135	0,797	0,323	0,013	0,053	0,006	0,014	0,012	11,589
136	0,787	0,459	0,012	0,047	0,005	0,005	0,011	1,169
137	0,222	0,296	0,000	0,045	0,005	0,382	0,075	10,094
138	0,005	0,065	0,012	0,047	0,005	0,005	0,011	0,426
139	0,243	0,294	0,012	0,046	0,005	0,028	0,011	0,011
140	0,406	0,201	0,012	0,047	0,005	0,005	0,011	0,012
141	0,190	0,201	0,012	0,048	0,006	0,196	0,011	13,727
142	1,010	0,686	0,012	0,047	0,005	0,005	0,011	1,304
143	0,407	0,519	0,283	0,047	0,017	1,178	0,026	2,461
144	0,338	0,376	0,264	0,048	0,035	0,869	0,527	0,084
145	0,074	0,532	0,377	0,048	0,018	0,483	0,027	0,621
146	0,149	0,289	0,943	0,682	0,432	1,255	1,264	1,314
147	0,368	0,180	1,925	2,091	0,622	1,236	1,054	0,227
148	0,006	0,374	3,283	1,000	0,830	1,371	1,449	0,011
149	0,007	0,003	1,491	2,818	1,124	3,766	2,529	18,251
150	0,007	0,126	0,151	0,047	0,017	0,908	0,079	6,231
152	0,635	0,211	0,868	0,047	0,225	0,966	0,263	1,022
153	0,451	0,418	0,011	0,042	0,004	0,005	0,011	1,174
156	1,418	0,644	0,554	0,040	0,004	0,046	0,000	4,589
157	0,866	0,395	0,011	0,041	0,004	0,005	0,012	1,827
158	0,006	0,132	0,011	0,040	0,004	0,005	0,012	0,011
159	0,623	0,373	0,011	0,040	0,004	0,005	0,011	0,171
161	0,520	0,441	0,011	0,041	0,004	0,005	0,012	4,546
162	0,006	0,003	0,012	0,044	0,004	0,005	0,012	0,299
163	1,682	0,710	0,220	0,038	0,150	0,225	0,318	1,995
164	1,010	0,728	0,011	0,039	0,004	0,005	0,011	2,508
165	0,150	0,003	0,076	0,068	0,012	0,005	0,182	0,011
166	0,904	0,291	0,074	0,063	0,012	0,005	0,015	0,742
167	0,410	0,601	0,073	0,064	0,012	0,005	0,015	0,521
168	0,403	0,394	1,999	0,061	0,011	0,769	1,773	3,223
169	0,007	0,003	0,081	0,074	0,012	0,005	0,591	0,011
170	0,006	0,287	0,071	0,059	0,011	0,015	0,076	0,011
172	0,539	0,398	0,077	0,066	0,013	0,006	0,017	1,671
173	0,678	0,505	0,071	0,062	0,011	0,005	0,016	1,360
174	1,357	0,388	0,070	0,063	0,012	0,328	0,016	5,847
178	0,515	0,383	0,022	0,083	0,025	0,198	0,321	4,401
179	0,331	0,212	0,027	0,100	0,030	0,009	0,016	0,011
180	0,705	0,462	0,021	0,077	0,023	0,183	1,044	1,319
181	0,641	0,756	0,021	0,079	0,023	0,711	2,382	0,508
182	0,518	0,530	0,020	0,078	0,024	0,227	1,405	0,486
183	0,425	0,481	0,283	0,081	0,920	1,796	8,913	1,503
184	0,007	0,003	0,021	0,080	0,025	0,008	0,554	0,011
185	0,007	0,008	0,021	0,076	0,024	0,029	0,402	0,288
186	0,007	0,003	0,022	0,079	0,025	0,132	0,014	0,011
187	0,007	0,003	0,022	0,059	0,007	0,004	0,007	0,011
188	0,893	0,003	0,022	0,059	0,007	0,077	0,007	1,870
189	0,039	0,056	0,021	0,058	0,006	0,011	0,385	0,192
190	0,010	0,004	0,021	0,059	0,007	0,004	0,019	0,012
191	0,011	0,004	0,021	0,057	0,006	0,273	0,885	0,012
192	0,011	0,004	0,021	0,060	0,007	0,004	0,372	0,011
193	0,011	0,004	0,021	0,058	0,006	0,155	0,519	1,509
196	0,012	0,004	0,022	0,059	0,007	0,004	0,115	0,013
197	0,009	0,004	0,022	0,060	0,007	0,004	0,007	0,012
198	0,655	0,004	0,021	0,055	0,006	0,398	0,971	0,264
199	0,012	0,005	0,020	0,052	0,006	0,353	0,618	0,384
200	0,700	0,274	0,021	0,054	0,006	0,228	0,424	0,013

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
201	0,120	0,603	1,178	0,632	0,515	0,625	0,006	0,347
202	0,004	0,396	1,349	1,116	0,624	0,976	0,476	0,391
203	0,004	0,000	1,335	0,019	0,557	0,005	0,007	0,005
205	0,120	0,383	0,614	0,751	0,342	0,547	0,054	0,052
206	0,004	0,063	0,584	0,010	0,142	0,000	0,006	0,005
207	0,004	0,287	0,501	0,443	0,083	0,384	0,261	0,048
210	0,008	0,206	0,693	0,267	0,529	0,585	0,139	0,195
212	0,190	0,285	0,381	0,010	0,377	0,496	0,114	0,244
214	0,185	0,448	0,628	0,800	0,353	0,594	0,297	0,324
215	0,004	0,117	0,507	0,133	0,004	0,056	0,005	0,005
216	0,004	0,224	0,139	0,011	0,198	0,192	0,005	0,005
217	0,004	0,334	0,342	0,010	0,025	0,192	0,005	0,005
218	0,004	0,236	0,380	0,308	0,003	0,684	0,005	0,004
219	0,004	0,246	0,255	0,113	0,121	0,613	0,005	0,004
220	0,004	0,144	0,451	0,165	0,439	0,378	0,005	0,020
221	0,004	0,184	0,255	0,008	0,094	0,688	0,005	0,123
223	0,004	0,240	0,158	0,008	0,161	0,395	0,005	0,004
224	0,004	0,358	0,261	0,158	0,185	0,568	0,005	0,004
225	0,011	0,302	0,020	0,008	7,337	0,911	0,008	0,005
226	0,011	0,041	1,472	0,008	1,834	0,316	0,008	0,177
227	0,011	0,298	1,924	0,240	0,148	1,299	0,008	0,005
228	0,011	0,420	3,455	0,263	3,166	0,828	0,751	0,377
229	0,012	0,004	2,513	0,038	0,031	0,455	0,008	0,005
230	1,342	0,322	1,806	0,008	0,030	1,086	0,008	0,005
231	0,004	0,004	0,007	0,011	0,009	0,005	0,008	0,006
232	0,052	0,144	0,379	0,009	0,470	0,518	0,006	0,004
235	0,004	0,003	0,177	0,010	0,256	0,715	0,006	0,005
236	0,004	0,250	0,006	0,010	0,007	0,005	0,498	0,395
237	0,233	0,479	0,722	0,515	0,134	0,403	0,006	0,005
238	0,004	0,072	0,036	0,009	0,006	0,128	0,006	0,005
240	0,004	0,258	0,287	0,271	0,096	0,142	0,005	0,106
241	0,245	3,497	1,059	1,614	0,114	0,814	1,072	0,758
244	0,004	0,003	0,105	0,007	0,005	0,229	0,005	0,004
245	0,004	0,229	0,075	0,006	0,165	0,457	0,472	0,008
246	0,017	0,291	0,191	0,142	0,279	0,535	0,615	0,224
247	0,004	0,371	0,538	0,265	0,408	0,663	0,320	0,020
248	0,004	0,061	0,170	0,006	0,005	0,147	0,133	0,004
249	0,444	0,753	0,949	1,295	0,395	0,711	0,364	0,231
253	0,004	0,119	0,501	0,166	0,258	0,219	0,123	0,071
254	0,116	0,383	0,635	0,804	0,025	0,362	0,005	0,075
255	0,003	0,168	0,205	0,107	0,032	0,167	0,005	0,030
256	0,038	0,306	0,456	0,395	0,431	0,288	0,005	0,030
257	0,003	0,168	0,196	0,141	0,121	0,206	0,097	0,097
259	0,005	0,003	0,057	0,006	0,168	0,304	0,006	0,005
260	0,005	1,512	0,488	0,006	0,900	0,542	0,006	0,000
261	0,005	0,003	0,262	0,006	0,298	0,005	0,127	0,163
262	0,175	0,073	0,255	0,176	1,104	0,603	0,848	0,238
263	0,005	0,003	0,172	0,006	0,006	0,005	0,007	0,005
264	0,054	0,414	0,574	0,610	0,256	0,713	0,443	0,520
266	0,105	0,722	0,971	0,951	0,267	0,446	0,005	0,003
267	0,003	2,582	0,435	0,174	0,260	0,225	0,074	1,153
270	0,807	1,025	1,576	2,590	0,888	0,863	0,017	0,292
271	0,204	0,241	0,534	0,955	0,436	0,004	0,005	0,003
273	3,687	0,653	0,802	0,993	0,946	4,415	2,918	3,309
274	0,603	0,166	0,535	0,575	0,120	1,120	0,118	0,003
275	0,405	0,208	0,222	0,238	0,496	1,201	1,463	1,194
276	0,005	0,003	0,156	0,513	0,238	0,420	0,486	0,057

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
201	2,255	0,680	0,019	0,052	0,006	0,958	1,546	2,362
202	0,966	0,689	0,021	0,056	0,006	0,120	0,338	3,452
203	0,011	0,005	0,021	0,054	0,006	0,485	0,122	8,008
205	0,075	0,020	0,020	0,050	0,006	0,203	0,273	1,214
206	0,010	0,004	0,022	0,057	0,004	0,004	0,008	0,012
207	0,480	0,004	0,044	0,053	0,006	0,004	0,007	0,840
210	0,827	0,306	0,040	0,047	0,005	0,087	0,007	3,108
212	1,605	0,503	0,037	0,044	0,005	0,486	0,390	1,577
214	0,907	0,306	0,035	0,042	0,112	0,675	0,541	6,851
215	0,010	0,004	0,040	0,047	0,005	0,371	2,911	15,316
216	0,010	0,004	0,038	0,044	0,005	0,486	0,397	3,744
217	0,239	0,117	0,038	0,045	0,005	0,344	0,253	1,636
218	0,010	0,004	0,015	0,040	0,003	0,004	0,009	2,464
219	0,010	0,065	0,419	0,038	0,073	0,224	0,340	0,012
220	0,319	0,085	0,043	0,038	0,070	0,224	0,134	0,640
221	0,010	0,012	0,188	0,038	0,483	1,204	0,457	0,012
223	0,009	0,665	0,217	0,038	0,215	0,338	1,792	0,013
224	0,703	0,165	0,376	0,038	0,128	0,701	0,663	1,706
225	0,014	0,006	0,015	0,039	0,003	0,144	0,009	0,015
226	0,865	0,556	0,015	0,040	0,023	0,177	0,009	0,013
227	0,014	0,006	0,015	0,039	0,003	0,008	0,009	0,014
228	0,014	0,699	0,415	0,097	0,005	0,018	0,247	0,014
229	0,014	0,006	0,021	0,113	0,005	1,747	0,015	3,215
230	1,513	0,006	5,774	0,134	1,652	7,754	5,973	10,687
231	0,015	0,007	0,021	0,113	0,005	1,129	0,015	0,466
232	0,011	0,005	0,025	0,131	0,006	0,023	0,017	0,013
235	0,012	0,005	0,027	0,144	0,007	0,024	0,019	0,014
236	0,011	0,443	0,026	0,139	0,005	0,019	0,018	3,951
237	0,012	0,005	0,024	0,121	0,006	0,021	0,017	0,014
238	0,011	0,005	0,020	0,104	0,005	1,292	0,014	4,190
240	0,492	0,134	0,254	0,038	0,003	0,322	0,035	0,099
241	1,200	0,632	0,021	0,038	0,003	1,154	0,354	1,664
244	0,009	0,004	0,022	0,039	0,046	0,201	0,012	0,012
245	0,009	0,189	0,021	0,037	0,098	0,724	0,283	5,289
246	0,100	0,165	0,551	0,000	0,088	0,224	0,602	2,332
247	0,317	0,192	1,250	0,037	0,088	0,248	0,342	0,011
248	0,044	0,146	0,024	0,042	0,004	0,005	0,013	1,886
249	0,383	0,394	0,275	0,037	0,153	0,290	0,224	0,632
253	0,339	0,075	0,623	0,047	0,335	0,637	0,329	2,236
254	0,261	0,117	0,566	0,046	0,068	0,441	0,288	0,824
255	0,008	0,018	0,170	0,046	0,055	0,246	0,219	0,214
256	0,000	0,040	0,021	0,052	0,007	0,123	0,015	5,064
257	0,110	0,167	0,019	0,047	0,007	0,333	0,014	6,234
259	0,009	0,005	0,020	0,049	0,007	0,007	0,014	0,013
260	2,857	0,060	0,021	14,347	0,007	0,731	8,137	2,657
261	0,008	0,134	0,024	0,059	0,008	0,008	0,017	0,013
262	0,092	0,779	2,667	6,069	0,257	0,523	2,598	0,087
263	0,010	0,006	0,027	0,048	0,004	0,005	0,019	0,013
264	0,668	0,323	0,021	0,043	0,400	1,344	0,442	1,192
266	0,006	0,003	0,022	0,039	0,003	0,004	0,015	2,001
267	1,777	0,121	0,022	0,040	0,003	0,946	0,015	19,594
270	1,264	0,703	0,692	0,037	0,122	0,232	0,014	0,704
271	0,843	0,118	0,021	0,038	0,003	0,004	0,015	0,012
273	7,975	2,138	0,022	0,040	0,003	0,601	13,289	13,044
274	0,006	0,095	0,023	0,041	0,003	0,005	0,016	0,014
275	4,181	1,486	0,017	0,035	0,004	0,232	1,604	16,713
276	0,387	0,186	0,018	1,327	0,004	0,005	0,012	9,807

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
277	0,035	0,420	0,114	0,333	0,571	0,381	0,368	0,063
279	0,216	0,003	0,385	0,253	0,405	0,513	0,004	0,003
280	2,237	2,892	1,180	1,989	0,827	2,985	0,425	0,773
281	0,004	2,442	0,359	0,332	0,290	0,497	0,000	0,003
282	3,598	0,736	0,467	0,743	0,510	5,076	0,255	0,309
283	0,004	0,003	0,280	0,267	0,366	0,392	0,461	0,147
284	0,256	0,723	0,321	0,540	0,666	1,084	0,803	0,687
288	1,714	0,777	1,528	4,153	0,894	2,439	0,417	0,391
289	2,670	2,141	0,572	0,657	0,500	3,622	0,378	0,280
291	0,371	0,464	1,047	1,165	1,466	0,895	0,446	0,264
292	0,621	0,413	0,802	1,148	1,061	1,380	0,806	0,708
293	0,004	0,402	1,236	1,074	1,011	1,604	0,649	0,475
294	0,515	0,799	1,612	1,304	1,512	1,098	1,618	1,281
295	0,004	3,169	1,157	1,148	0,710	0,941	2,892	1,576
296	0,591	4,651	0,451	0,576	1,398	1,663	6,346	4,274
297	0,149	0,313	0,659	0,212	0,736	0,885	1,684	1,078
298	0,004	0,912	1,295	0,839	0,543	1,230	0,528	0,720
299	0,192	3,928	0,373	0,379	0,817	0,702	3,196	2,354
300	0,664	0,611	1,129	1,555	1,802	0,816	0,962	0,374
301	1,997	3,266	2,275	3,077	1,856	2,305	0,818	0,286
302	0,454	0,004	0,793	0,790	0,799	0,198	0,495	0,420
303	0,265	0,109	0,215	0,464	0,450	0,056	0,522	0,323
307	0,224	1,501	0,917	1,201	1,903	0,684	0,754	1,227
308	4,336	0,458	0,789	1,097	1,451	4,443	0,840	1,506
309	0,754	0,344	0,508	1,139	0,621	0,357	0,361	1,295
310	0,373	0,359	0,504	0,640	0,727	0,342	0,565	0,707
311	0,338	0,235	0,416	0,617	0,633	0,129	0,420	0,805
312	1,832	1,956	2,509	2,575	1,047	1,748	1,755	0,937
313	0,287	0,924	0,006	0,006	0,366	0,499	0,007	0,007
315	0,655	0,420	1,388	0,491	0,666	0,515	0,798	0,502
316	1,777	0,237	1,071	1,347	0,512	2,175	1,249	0,518
318	0,783	0,378	1,677	1,389	1,536	0,568	1,480	0,611
319	0,220	0,076	0,804	0,380	0,701	0,127	0,600	0,223
322	0,005	0,003	0,011	1,429	0,491	0,705	0,006	0,006
323	0,004	0,003	0,006	0,009	0,373	0,005	0,007	0,005
324	0,609	0,444	1,532	0,590	0,772	0,851	0,773	0,940
325	0,180	0,003	0,667	0,224	0,772	0,005	0,006	0,005
326	0,005	0,004	0,006	0,010	0,003	0,006	0,007	0,006
327	0,004	0,047	0,039	0,083	0,130	0,005	0,007	0,006
328	0,005	0,004	0,010	0,012	0,649	0,006	0,008	0,007
329	0,005	2,064	0,010	0,013	0,137	0,006	0,009	0,007
330	0,005	1,223	0,011	0,014	0,005	0,007	0,009	0,008
332	2,204	2,779	0,324	0,482	0,662	2,304	0,008	0,214
333	0,005	2,772	0,011	0,014	0,005	0,007	0,009	0,007
334	0,953	0,004	0,011	0,014	0,228	0,686	0,009	0,007
335	0,005	0,005	1,223	3,353	1,503	0,012	0,009	0,007
337	0,006	0,006	0,019	0,017	0,006	0,007	0,009	0,007
338	0,005	0,005	0,066	0,015	0,660	0,006	0,009	0,006
339	0,005	4,653	0,612	0,016	1,006	0,006	0,439	0,674
340	0,015	0,290	3,092	1,356	1,006	0,372	1,639	1,659
342	0,008	0,005	1,191	1,306	1,371	0,008	5,383	3,379
343	0,008	0,005	0,039	0,014	0,036	0,007	0,016	0,008
346	0,007	0,022	0,007	0,014	0,067	0,007	0,014	0,264
347	0,008	0,005	0,124	0,014	0,037	0,008	0,016	0,009
349	0,008	1,678	0,007	0,013	0,034	0,008	0,015	0,008
350	5,116	0,101	0,855	1,859	0,004	5,461	4,578	3,140
351	1,328	1,160	0,007	0,010	0,003	1,466	0,008	0,005

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
277	0,353	0,313	0,018	0,038	0,004	0,163	0,012	22,478
279	0,085	0,164	0,017	0,035	0,004	0,030	0,012	14,901
280	2,868	1,077	0,017	0,034	0,004	0,163	0,011	25,100
281	5,387	0,334	4,933	13,007	2,716	3,730	9,080	9,160
282	1,420	0,209	0,018	0,035	0,004	0,005	0,011	8,252
283	0,253	0,243	0,016	0,035	0,004	0,005	0,011	1,002
284	1,290	0,741	0,017	1,228	0,004	0,104	0,173	4,181
288	13,451	0,510	0,023	5,118	0,005	1,019	0,345	18,822
289	3,523	0,233	0,026	0,045	0,006	0,173	0,013	6,065
291	0,851	0,743	0,023	9,864	0,005	0,064	0,012	2,057
292	4,344	1,287	0,025	0,042	0,006	0,007	2,258	3,854
293	1,081	0,985	0,022	9,039	0,060	0,801	1,368	0,012
294	0,010	1,773	0,360	9,947	0,115	0,577	1,112	2,471
295	2,567	0,814	0,023	2,476	0,005	0,006	0,012	11,677
296	9,889	4,112	9,344	2,518	2,382	2,943	0,013	8,813
297	8,291	0,472	0,106	3,703	0,003	0,333	0,618	0,013
298	0,010	0,761	0,145	3,272	0,004	0,417	0,582	10,827
299	3,470	1,928	0,387	6,328	0,031	0,799	0,812	15,338
300	3,510	0,490	0,242	5,177	0,024	0,586	0,618	9,606
301	2,813	0,185	0,010	0,039	0,004	0,005	2,355	0,012
302	0,478	0,269	0,010	0,036	0,004	0,005	0,000	0,218
303	0,746	0,350	0,010	4,243	0,004	0,045	0,247	0,424
307	1,653	1,135	1,094	4,890	0,272	0,611	1,085	0,584
308	5,022	1,788	0,014	1,282	0,004	1,003	0,011	23,027
309	2,612	0,222	0,013	15,754	0,004	0,132	6,679	4,559
310	1,451	0,925	0,245	2,455	0,004	0,079	0,195	1,234
311	0,915	0,427	0,013	3,700	0,004	0,251	0,010	0,013
312	1,777	0,728	0,013	1,685	0,004	0,007	0,010	10,611
313	5,639	0,006	0,016	0,066	0,005	0,007	0,016	0,024
315	1,190	0,978	0,013	4,983	0,005	0,007	0,010	0,499
316	2,466	0,230	13,338	0,038	4,992	8,282	12,343	17,309
318	1,951	0,960	0,014	4,763	0,004	0,007	0,010	0,225
319	0,579	0,275	0,014	0,039	0,005	0,007	0,011	0,242
322	0,010	0,378	0,549	7,511	0,192	0,523	0,524	6,785
323	0,476	0,349	0,408	22,955	0,089	1,574	4,410	13,260
324	1,572	0,382	0,008	10,125	0,004	0,414	0,010	11,771
325	0,010	0,283	0,009	0,032	0,004	0,005	0,011	0,596
326	0,012	0,005	0,010	0,331	0,004	0,212	0,011	0,363
327	0,011	0,005	0,009	23,255	0,004	0,316	0,352	9,880
328	0,013	0,005	0,010	0,811	0,004	0,005	0,011	0,013
329	3,998	0,005	0,009	8,082	0,004	0,257	0,010	6,075
330	0,711	0,005	0,009	8,803	0,004	0,005	0,011	10,930
332	12,360	0,291	0,008	0,035	0,003	0,294	0,007	6,507
333	0,014	0,006	0,008	0,034	0,003	0,768	0,007	13,853
334	0,013	0,005	0,009	1,797	0,137	0,354	4,374	2,326
335	7,021	0,007	0,008	0,033	0,258	0,622	0,499	0,013
337	0,012	0,007	0,146	0,031	0,003	1,610	2,559	0,014
338	2,326	0,123	0,007	0,032	0,002	0,164	0,007	17,353
339	0,034	0,338	0,007	0,031	0,028	0,447	0,285	20,262
340	1,420	1,249	0,204	0,031	0,026	0,168	0,117	20,326
342	6,936	1,107	0,013	0,044	0,003	0,005	0,009	1,690
343	0,016	0,010	0,088	0,034	0,016	0,096	0,138	0,015
346	0,727	0,334	0,013	0,036	0,019	0,726	0,116	17,787
347	0,017	0,011	0,010	0,036	0,003	0,004	0,008	7,663
349	3,650	0,010	0,039	0,034	0,112	0,123	0,145	12,748
350	5,633	2,703	0,010	0,035	0,002	0,526	0,007	7,886
351	0,010	0,004	0,011	0,036	0,002	0,177	0,007	0,013

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
353	1,150	1,516	0,317	1,097	0,368	1,359	5,246	3,460
354	0,042	0,005	0,045	0,327	0,433	0,132	0,007	0,205
355	3,525	0,005	0,006	0,145	0,117	3,664	7,392	5,424
357	0,210	0,121	0,421	1,515	0,033	0,282	0,300	0,299
358	0,005	0,214	0,005	0,009	0,032	0,157	0,312	0,267
359	0,005	0,139	1,677	2,752	2,738	0,039	0,000	0,049
360	0,005	0,037	0,608	0,614	1,262	0,024	0,012	0,008
361	0,005	1,203	0,187	0,009	0,032	1,467	0,013	0,008
362	0,005	0,158	0,324	0,623	0,035	1,396	0,012	0,057
364	0,041	0,064	0,211	0,572	0,416	0,150	0,082	0,092
365	0,116	0,457	1,028	2,644	0,846	0,919	1,042	1,135
366	0,355	1,721	1,267	3,048	0,941	0,734	1,142	1,458
367	0,227	2,222	2,131	5,311	1,781	1,064	1,380	1,305
371	0,004	0,004	1,907	0,091	6,000	0,006	0,008	0,005
373	0,347	0,495	3,097	1,269	0,154	0,514	1,016	0,753
374	0,157	0,154	3,979	2,663	0,034	1,916	1,486	1,093
375	0,005	0,004	0,013	0,015	0,032	0,007	0,010	0,006
376	0,004	0,004	0,882	0,012	0,033	0,006	0,007	0,005
378	2,487	0,167	0,088	0,010	0,005	3,369	0,044	0,045
379	0,458	0,852	0,577	4,388	0,288	1,022	2,388	2,859
380	0,026	0,463	0,285	0,203	0,392	0,248	0,029	0,045
382	0,013	0,351	0,224	0,010	0,184	0,088	0,005	0,147
384	0,304	0,889	0,404	0,010	0,797	0,537	0,142	0,446
385	0,004	1,491	0,363	0,213	0,203	0,310	0,273	0,375
392	0,171	0,568	2,990	4,360	0,003	0,005	0,011	0,007
395	0,352	0,003	0,390	0,841	0,901	0,683	0,071	0,240
396	0,229	0,377	0,700	0,301	0,638	0,438	0,256	0,364
397	0,779	1,464	1,326	1,028	0,215	0,696	0,197	0,486
398	0,144	0,371	0,580	0,280	0,007	0,032	1,919	1,489
399	0,108	0,235	0,452	0,215	0,008	0,007	0,019	0,222
400	1,401	1,904	1,297	1,821	0,008	0,007	0,523	0,657
401	1,913	2,498	1,701	2,289	0,588	1,656	0,416	0,381
402	4,890	2,862	0,262	0,619	0,565	5,817	0,519	0,217
403	0,634	2,808	0,752	1,372	0,483	1,346	2,861	2,165
405	0,203	0,539	0,553	0,963	0,752	0,158	0,004	0,003
406	2,811	2,827	0,245	0,684	0,998	3,011	2,540	2,055
408	0,180	0,529	0,256	3,326	0,092	0,336	0,004	0,262
409	0,003	0,004	0,251	0,007	0,094	0,004	0,005	0,004
410	0,174	0,555	0,274	0,007	0,181	0,408	0,004	0,398
411	3,477	0,003	0,227	0,008	0,049	4,330	0,195	0,110
412	0,097	0,003	0,152	0,007	0,705	0,351	0,004	0,110
413	0,003	0,032	0,325	0,007	0,261	0,078	0,004	0,489
414	3,524	0,003	0,002	0,007	0,254	4,893	0,005	0,004
415	0,543	0,239	0,217	0,135	0,304	0,305	0,033	0,033
418	0,710	0,510	0,276	0,348	0,560	0,491	0,356	0,234
419	0,549	0,750	0,426	0,157	0,833	0,247	0,157	0,430
421	0,753	0,474	0,289	0,326	0,273	0,552	0,314	0,322
424	0,454	0,228	0,514	0,442	0,987	0,363	0,140	0,183
426	0,370	0,168	0,198	0,629	0,310	0,193	0,097	0,166
427	0,567	0,136	0,153	0,247	0,339	0,182	0,086	0,175
430	2,243	0,426	0,413	0,408	0,462	2,539	0,004	0,189
431	0,449	1,217	1,056	0,972	0,630	1,145	2,120	2,234
432	0,207	0,207	0,133	0,192	0,656	0,097	0,004	0,382
433	0,659	0,261	0,432	0,438	1,274	0,431	0,024	0,319
434	0,480	0,441	0,110	0,083	0,494	0,334	0,004	0,223
438	0,852	0,219	0,137	0,264	0,690	0,387	0,004	0,038
440	0,524	0,402	0,286	0,214	0,570	0,383	0,761	0,981

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
353	1,948	2,906	0,011	0,042	0,003	0,131	0,008	0,013
354	0,156	0,158	0,011	0,038	0,003	0,081	0,008	1,619
355	4,686	3,894	0,010	0,034	0,012	0,227	0,094	0,868
357	0,479	0,243	6,555	0,037	2,328	5,597	6,799	1,626
358	2,478	0,169	0,013	0,039	0,003	0,049	0,007	6,671
359	0,233	0,059	0,048	1,041	0,206	1,319	0,292	0,017
360	0,014	0,118	0,015	0,000	0,141	0,792	0,459	0,017
361	0,014	0,007	0,013	0,038	0,003	0,006	0,007	14,687
362	0,014	1,053	0,012	0,039	0,274	0,878	0,007	0,017
364	0,387	0,167	0,013	0,039	0,003	0,006	0,008	0,456
365	1,716	0,857	1,270	0,038	0,894	2,430	0,102	0,851
366	1,788	0,873	11,308	0,041	3,366	5,554	0,131	0,258
367	2,380	1,098	1,466	0,068	0,950	1,986	2,930	2,066
371	0,081	0,006	0,003	11,250	0,001	0,010	0,074	13,525
373	0,843	0,006	0,003	0,024	0,001	0,046	0,129	0,014
374	0,843	0,006	0,147	0,024	0,006	0,339	0,047	0,014
375	0,010	0,007	0,228	0,024	0,134	0,665	0,452	7,028
376	0,008	0,006	1,992	1,530	0,940	1,711	2,154	0,014
378	0,009	0,004	0,003	0,025	0,002	0,068	0,003	5,452
379	5,026	2,494	3,353	8,604	4,012	6,119	7,712	3,084
380	0,025	0,255	0,020	0,038	0,011	0,331	0,152	1,062
382	0,509	0,134	0,076	0,039	0,157	1,418	1,395	15,331
384	0,254	0,320	0,016	0,041	0,004	1,081	0,013	7,192
385	2,076	0,268	0,015	0,040	0,027	0,822	0,013	7,461
392	0,027	0,009	4,806	0,035	1,745	2,644	4,639	16,671
395	0,890	0,594	0,010	0,036	0,003	0,008	0,008	1,362
396	1,095	0,487	0,010	0,036	0,106	0,319	0,008	1,944
397	1,526	0,943	0,010	0,034	0,003	0,319	0,007	0,520
398	0,006	2,097	0,010	0,036	0,003	0,331	0,008	17,827
399	0,475	0,386	0,010	0,035	0,003	0,323	0,007	20,699
400	4,854	1,053	0,010	0,035	0,003	0,191	0,008	11,637
401	0,256	0,319	0,010	0,037	0,003	0,424	0,007	14,827
402	4,370	0,470	2,873	0,035	1,292	2,208	3,746	3,355
403	1,582	2,329	0,010	0,036	0,003	0,218	0,102	4,991
405	0,584	0,003	0,028	0,040	0,004	0,403	0,012	16,366
406	1,838	1,871	0,026	0,039	0,065	0,447	0,012	5,568
408	0,816	0,003	0,028	0,041	0,004	0,005	0,013	0,373
409	0,007	0,004	0,029	0,043	0,004	0,005	0,013	8,820
410	0,846	0,122	0,028	0,044	0,232	1,075	1,011	17,716
411	3,305	0,501	19,526	0,041	3,716	4,798	12,378	10,561
412	0,157	1,527	0,026	0,036	0,027	0,197	0,184	2,300
413	2,577	0,004	0,031	0,044	0,004	0,005	0,014	3,609
414	0,439	0,004	0,028	0,041	0,004	0,158	0,012	10,815
415	0,137	0,043	0,031	0,044	0,004	0,005	0,014	2,628
418	0,288	0,195	3,370	0,037	1,503	1,765	3,579	3,981
419	0,274	0,053	0,017	0,047	0,004	0,207	1,527	6,303
421	0,929	0,155	0,015	0,039	0,004	0,690	2,218	15,554
424	0,446	0,282	0,015	0,041	0,004	0,119	0,010	1,921
426	0,683	0,319	0,014	0,037	0,198	1,075	0,088	7,543
427	0,433	0,235	0,014	0,037	0,004	0,021	0,010	0,617
430	0,322	0,100	0,015	0,039	0,004	0,004	0,011	0,486
431	2,587	1,845	0,012	0,038	0,003	0,143	0,009	2,775
432	2,044	0,916	0,689	0,034	0,150	0,555	0,675	0,013
433	1,661	0,791	0,000	0,037	0,006	0,401	0,009	11,039
434	3,343	0,491	0,012	0,036	0,003	1,113	0,025	20,955
438	1,066	0,488	0,011	0,036	0,003	0,289	0,008	12,847
440	1,285	0,834	0,226	0,035	0,003	0,455	0,008	17,895

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
441	0,362	0,723	0,211	0,443	0,735	0,773	2,362	2,118
442	0,791	0,884	0,895	1,505	0,760	1,250	0,987	1,025
443	1,578	0,129	0,116	0,303	0,429	1,486	0,005	0,185
446	0,110	0,174	0,301	0,682	0,527	0,268	0,005	0,162
450	0,472	0,148	0,097	0,527	0,553	0,664	0,005	0,196
452	0,304	0,109	0,342	0,440	0,549	0,007	5,204	4,149
453	0,005	0,004	0,006	0,008	0,061	0,008	0,005	0,116
454	0,095	0,003	0,051	0,008	0,206	0,006	0,006	0,004
457	2,382	2,266	3,142	4,458	0,526	2,305	0,005	0,032
459	0,646	0,421	0,363	0,008	0,812	0,007	0,005	0,004
460	0,177	0,322	0,572	1,955	0,447	0,007	0,005	0,084
461	0,004	0,004	0,004	0,007	0,210	0,084	0,005	0,004
462	0,745	1,055	1,348	1,266	0,219	0,903	0,005	0,004
463	0,891	0,879	1,285	1,441	0,523	1,360	0,005	0,090
465	0,753	0,334	0,874	0,061	0,281	1,498	0,005	0,004
466	3,827	0,129	0,446	0,337	0,675	4,508	0,104	0,283
477	0,085	0,004	1,257	2,548	0,289	0,136	0,005	0,004
478	0,352	0,122	0,092	0,284	0,343	0,240	0,004	0,115
479	0,004	0,484	0,333	0,648	0,486	0,724	0,270	0,456
504	0,348	1,169	1,910	0,743	0,363	0,571	2,597	2,100
507	0,312	0,618	0,649	0,638	0,404	0,736	0,310	0,241
508	0,194	0,100	0,148	0,196	0,308	0,357	0,009	0,086
509	0,366	0,350	0,253	0,262	0,319	0,487	0,061	0,149
510	0,005	0,388	0,694	0,688	0,574	0,759	0,415	0,402
512	0,564	0,585	0,602	0,360	0,191	0,650	0,003	0,042
514	1,994	1,280	1,254	1,313	0,472	1,957	0,003	0,160
517	1,115	0,593	0,815	1,178	1,035	1,338	0,472	0,629
518	0,478	0,694	0,411	0,682	0,663	0,442	0,004	0,137
519	0,116	0,156	0,263	0,297	0,399	0,575	0,173	0,158
520	0,063	0,179	0,220	0,082	0,316	0,258	0,004	0,097
525	0,043	0,003	0,303	0,005	1,099	0,195	0,004	0,003
526	0,183	0,439	0,425	0,420	0,640	0,711	0,514	0,634
527	0,630	0,142	0,254	0,482	0,561	0,409	0,004	0,102
528	0,547	0,243	0,142	0,224	0,304	0,509	0,004	0,021
529	0,404	0,497	0,854	0,801	1,073	0,479	0,109	0,208
531	0,019	0,194	0,201	0,296	0,193	0,125	0,004	0,004
536	0,396	0,511	0,751	0,849	0,524	0,396	0,004	0,071
537	0,004	0,385	0,977	0,277	0,354	0,029	0,004	0,004
538	0,003	0,210	0,271	0,004	0,208	0,186	0,004	0,024
539	0,560	0,519	0,613	0,443	0,143	0,513	0,004	0,005
540	1,513	1,526	1,424	1,664	0,226	1,433	0,004	0,003

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
441	2,133	1,659	0,102	0,036	0,067	0,482	0,008	6,017
442	2,048	0,847	0,011	0,035	0,003	0,000	0,009	1,471
443	0,276	0,156	0,012	0,038	0,003	0,004	0,009	4,784
446	0,207	0,247	0,013	0,039	1,407	0,004	0,009	7,833
450	1,059	0,430	0,012	0,039	0,003	0,004	0,008	0,014
452	0,748	4,387	0,011	0,035	0,003	0,443	0,008	9,423
453	0,009	0,004	0,014	0,043	0,003	0,004	0,009	14,479
454	0,009	0,004	0,011	0,034	0,003	0,413	0,074	1,298
457	5,727	0,004	0,479	1,122	0,123	0,221	0,437	0,014
459	0,547	0,307	0,065	0,033	0,025	0,664	0,408	10,153
460	0,849	0,084	0,012	0,038	0,003	0,004	0,008	7,368
461	0,279	0,022	0,012	0,038	0,003	0,004	0,008	0,229
462	0,016	0,004	0,022	0,061	0,005	0,014	0,016	15,041
463	0,698	0,172	0,023	0,066	0,006	0,014	0,017	0,014
465	0,008	0,004	0,022	0,063	0,006	0,014	0,016	0,013
466	0,912	0,161	0,026	0,073	0,007	0,016	0,019	0,421
477	0,029	0,003	0,023	0,064	0,006	0,014	0,017	1,527
478	0,286	0,239	0,021	0,061	0,005	0,013	0,016	0,013
479	1,182	0,428	0,023	0,061	0,006	1,204	0,015	0,175
504	0,007	1,843	0,026	0,074	0,006	0,013	0,019	13,345
507	0,734	0,320	0,039	0,039	0,005	0,005	0,027	1,114
508	0,338	0,168	0,040	0,040	0,005	0,005	0,028	0,011
509	0,588	0,197	0,043	0,041	0,006	0,005	0,030	0,011
510	1,416	0,404	0,046	9,770	0,006	0,005	0,029	1,010
512	0,385	0,018	0,045	0,044	0,006	0,005	0,031	0,011
514	0,593	0,230	0,043	0,042	0,006	0,602	0,029	0,011
517	0,640	0,563	0,046	0,040	0,006	0,006	0,033	1,106
518	0,679	0,340	0,045	0,043	0,006	0,005	0,032	0,012
519	0,321	0,174	0,047	0,046	0,006	0,005	0,032	6,880
520	0,377	0,143	0,044	0,044	0,006	0,005	0,031	2,075
525	0,007	0,003	0,022	0,044	0,004	0,005	0,017	0,013
526	1,653	0,782	0,020	0,039	0,004	0,005	0,016	0,859
527	0,836	0,311	0,021	0,041	0,004	0,052	0,016	4,124
528	0,572	0,043	0,021	0,042	0,024	0,337	0,016	1,460
529	0,631	0,265	0,000	0,039	0,004	0,178	0,016	0,012
531	0,169	0,003	1,102	0,782	0,004	0,028	0,016	0,012
536	0,301	0,124	0,020	0,039	0,004	0,005	0,016	0,035
537	0,008	0,004	0,021	0,042	0,004	0,005	0,017	0,013
538	0,500	0,003	0,029	0,057	0,006	0,006	0,024	0,011
539	0,017	0,066	0,035	0,043	0,003	0,006	0,027	0,011
540	0,006	0,009	0,033	0,042	0,004	0,006	0,389	0,011

Resultados em IR do ELISA das 376 amostras de soro de indivíduos residentes em área endêmica de malária para a determinação de anticorpos IgM contra os diferentes antígenos recombinantes dos blocos variáveis 2, 6 e 10 e da região conservada C-terminal (PvMSP1₁₉) da proteína de superfície do merozoíta (MSP1) de *P. vivax*.

Soro	Belém-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Belém-6	BR7-6
1	0,224	0,417	0,196	0,010	0,157	0,229	1,637	2,145
2	0,147	0,266	0,107	0,133	0,082	0,062	0,823	0,030
3	0,309	0,242	0,118	0,002	0,176	0,157	0,807	0,005
6	0,562	1,202	0,338	0,308	0,222	0,286	1,043	0,005
7	0,225	0,274	0,105	0,049	0,114	0,085	0,765	0,006
8	0,814	0,954	0,529	0,638	0,320	0,419	0,870	0,686
9	0,002	0,238	0,028	0,048	0,006	0,065	0,865	0,008
10	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001	0,005	0,782	0,008
11	0,002	0,039	0,002	0,002	0,009	0,020	1,011	0,008
13	0,089	0,203	0,086	0,002	0,041	0,044	0,798	0,008
14	0,063	0,109	0,019	0,002	0,018	0,048	0,851	0,007
15	0,209	0,511	0,191	0,196	0,191	0,247	0,859	0,285
16	0,196	0,276	0,165	0,043	0,115	0,166	0,805	0,008
17	0,175	0,209	0,064	0,031	0,061	0,084	0,799	0,008
18	0,260	0,390	0,383	0,004	0,229	0,163	0,801	0,008
19	0,121	0,280	0,191	0,139	0,147	0,135	0,781	0,008
20	0,575	0,513	0,261	0,213	0,212	0,247	0,833	0,013
21	0,801	0,966	0,593	3,057	0,154	0,359	0,834	0,995
23	0,797	0,665	0,275	0,511	0,284	0,398	0,822	0,120
24	0,448	0,642	0,180	0,043	0,093	0,165	0,834	0,013
25	0,536	0,568	0,289	0,326	0,166	0,336	0,891	0,012
26	0,633	0,778	0,287	0,791	0,494	0,466	0,743	0,008
27	0,049	0,140	0,044	0,005	0,050	0,031	0,803	0,008
32	0,520	0,793	0,246	0,352	0,349	0,295	0,792	0,099
33	0,272	0,757	0,287	0,582	0,359	0,248	0,743	0,403
35	0,315	0,494	0,181	0,434	0,105	0,185	0,770	0,502
36	0,200	0,343	0,171	0,204	0,172	0,120	0,822	0,010
37	0,526	1,059	0,559	0,593	0,469	0,365	0,755	0,179
38	0,526	1,029	0,635	0,525	0,368	0,312	0,781	0,009
39	0,462	0,820	0,682	0,722	0,355	0,460	0,807	0,508
40	0,425	0,924	0,749	0,473	0,158	0,269	0,994	1,204
41	0,234	0,370	0,246	0,198	0,101	0,167	0,794	0,010
43	0,334	0,494	0,307	0,695	0,198	0,304	0,831	0,010
44	0,619	0,832	0,636	0,502	0,459	0,553	0,857	0,010
45	0,039	0,043	0,003	0,009	0,042	0,039	0,793	0,010
47	0,546	0,910	0,548	0,651	0,415	0,444	0,828	1,453
50	1,114	0,948	0,443	0,344	0,543	0,854	0,963	0,376
52	0,374	0,514	0,226	0,242	0,325	0,273	0,802	0,079
53	0,313	0,920	0,214	0,317	0,346	0,431	0,841	0,600
54	0,307	0,604	0,203	0,118	0,204	0,317	0,873	0,006
55	0,156	0,264	0,091	0,089	0,041	0,103	0,802	0,006
56	0,283	0,307	0,003	0,004	0,176	0,138	0,815	0,011
57	0,316	0,578	0,096	0,248	0,250	0,350	0,838	0,010
58	0,270	0,709	0,166	0,070	0,261	0,262	0,788	0,010
59	0,124	1,699	0,204	0,444	0,130	0,351	0,773	0,010
60	0,159	0,541	0,320	0,263	0,259	0,482	0,727	0,010
61	0,208	0,501	0,220	0,127	0,164	0,169	0,689	0,005
62	0,174	0,673	0,211	0,159	0,213	0,190	0,840	0,058
63	0,063	0,200	0,074	0,047	0,090	0,055	0,792	0,005
64	0,029	0,297	0,114	0,056	0,073	0,081	0,969	0,102

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
1	0,013	0,437	0,008	0,101	0,340	0,103	0,039	0,009
2	0,013	0,002	0,008	0,008	0,011	0,048	0,005	0,009
3	0,013	0,007	0,007	0,008	0,011	0,111	0,004	0,009
6	0,013	0,191	0,008	0,009	0,012	0,004	0,005	0,186
7	0,013	0,002	0,008	0,008	0,011	0,004	0,004	0,009
8	0,156	0,455	0,009	0,009	0,011	0,278	0,004	1,865
9	0,013	0,004	0,008	0,008	0,011	0,004	0,004	0,011
10	0,013	0,004	0,007	0,008	0,011	0,004	0,004	0,011
11	0,013	0,004	0,008	0,008	0,011	0,004	0,004	0,010
13	0,013	0,033	0,004	0,007	0,005	0,065	0,041	0,011
14	0,013	0,004	0,004	0,007	0,000	0,092	0,041	0,010
15	0,013	0,432	0,370	0,493	0,454	0,335	0,583	0,011
16	0,014	0,003	0,479	0,710	0,897	0,540	0,661	0,012
17	0,014	0,003	0,004	0,007	0,005	0,135	0,132	0,013
18	0,014	0,105	0,484	0,580	0,897	0,848	1,346	0,013
19	0,014	0,003	0,440	0,435	0,378	0,384	0,220	0,012
20	0,014	0,106	0,466	0,725	0,708	0,591	0,417	0,013
21	0,618	0,304	0,005	0,007	0,795	0,510	1,044	6,215
23	0,224	0,020	0,008	0,012	0,028	0,003	0,011	0,013
24	0,014	0,007	0,008	0,012	0,006	0,003	0,003	0,013
25	0,014	0,046	0,008	0,012	0,006	0,109	0,022	7,854
26	0,013	0,254	0,008	0,013	0,006	0,003	0,090	0,630
27	0,013	0,003	0,008	0,012	0,006	0,003	0,003	0,009
32	0,013	0,198	0,137	0,012	0,044	0,170	0,286	0,342
33	0,013	0,321	0,008	0,012	0,006	0,003	0,003	0,378
35	0,013	0,143	0,008	0,012	0,006	0,003	0,017	0,351
36	0,015	0,002	0,009	0,013	0,006	0,003	0,003	0,013
37	0,138	0,214	1,372	1,833	2,751	1,200	0,718	0,012
38	0,843	0,175	1,148	0,558	0,692	0,715	0,291	0,012
39	0,815	0,307	1,462	0,739	1,232	1,205	0,590	0,012
40	0,608	0,016	1,910	1,000	2,854	3,690	0,962	3,746
41	0,014	0,002	0,614	0,007	0,119	0,485	0,137	0,012
43	0,019	0,224	0,803	0,196	0,178	0,605	0,197	0,012
44	0,019	0,526	0,691	0,094	0,070	0,775	0,470	0,012
45	0,019	0,004	0,480	0,007	0,005	0,140	0,004	0,012
47	0,019	0,265	0,007	0,033	1,203	0,289	1,174	0,012
50	0,021	0,485	0,494	0,541	0,502	0,604	0,498	2,177
52	0,013	0,270	0,228	0,011	0,180	0,328	0,269	0,010
53	0,175	0,088	0,000	0,685	1,184	0,615	0,416	1,050
54	0,013	0,207	0,007	0,011	0,000	0,053	0,087	0,010
55	0,013	0,002	0,006	0,011	0,009	0,092	0,105	0,010
56	0,017	0,009	0,025	0,110	0,483	0,477	0,211	0,014
57	0,016	0,009	0,070	0,409	0,123	0,420	0,291	0,015
58	0,015	0,008	0,057	0,011	0,010	0,263	0,187	0,015
59	0,014	0,008	0,164	0,006	0,236	0,090	0,098	0,013
60	0,015	0,008	0,319	0,472	0,436	0,364	0,489	0,014
61	0,013	0,038	0,261	0,186	0,277	0,283	0,175	0,010
62	0,014	0,074	0,186	0,186	0,287	0,286	0,198	0,010
63	0,013	0,002	0,106	0,006	0,102	0,108	0,081	0,010
64	0,013	0,023	0,034	0,006	0,003	0,108	0,002	0,010

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
65	0,399	0,746	0,385	0,273	0,303	0,338	0,873	0,234
66	0,386	0,272	0,558	0,085	0,378	0,371	1,992	0,590
67	0,429	0,167	0,540	0,008	0,481	0,313	2,674	0,434
68	0,057	0,004	0,090	0,007	0,083	0,005	0,091	0,004
69	0,212	0,004	0,324	0,007	0,130	0,079	0,809	0,013
70	0,166	0,120	0,193	0,007	0,150	0,064	0,928	0,065
71	0,281	0,203	0,209	0,007	0,242	0,170	1,191	0,048
72	0,446	0,144	0,159	0,008	0,361	0,405	0,034	0,353
74	0,347	0,291	0,262	0,008	0,354	0,225	0,033	0,291
76	0,361	0,378	0,341	0,262	0,288	0,309	0,035	0,663
77	0,303	0,046	0,004	0,008	0,220	0,138	0,039	0,024
78	0,158	0,049	0,004	0,008	0,151	0,005	0,042	0,005
80	0,187	0,043	0,174	0,007	0,130	0,090	0,035	1,200
81	0,844	0,578	2,008	0,008	0,808	0,543	0,053	2,480
82	0,213	0,073	0,199	0,008	0,196	0,046	0,038	0,210
83	0,452	0,418	1,214	1,667	0,354	0,281	0,040	0,911
84	0,150	0,065	1,159	0,007	0,058	0,058	0,043	0,182
85	0,567	0,004	0,244	0,008	0,397	0,424	0,045	0,602
86	0,263	0,680	0,336	0,298	0,115	0,200	0,041	0,194
88	0,549	0,251	0,466	0,008	0,376	0,453	0,042	0,631
89	0,473	0,340	0,358	0,008	0,275	0,226	0,042	0,114
90	0,157	0,279	0,094	0,008	0,103	0,058	0,039	0,345
91	0,475	0,067	0,324	0,027	0,195	0,262	0,046	0,276
92	0,296	0,171	0,166	0,026	0,133	0,147	0,038	0,123
93	0,146	0,040	0,151	0,230	0,091	0,077	0,036	0,157
94	0,085	0,104	0,255	2,196	0,007	0,002	0,039	0,000
95	0,289	0,401	0,178	0,026	0,094	0,269	0,036	0,123
96	0,585	0,404	0,560	0,014	0,307	0,301	0,038	0,331
97	0,454	0,379	0,668	0,255	0,244	0,428	0,047	0,619
98	0,456	0,283	0,364	0,362	0,220	0,298	0,039	0,439
99	0,199	0,004	0,299	0,009	0,169	0,002	0,061	0,005
100	0,473	0,361	0,820	0,007	0,297	0,339	0,049	0,452
102	0,316	0,227	0,243	0,007	0,268	0,248	0,037	0,314
103	0,223	0,006	0,031	0,030	0,058	0,040	0,038	0,389
104	0,172	0,094	0,162	0,057	0,051	0,037	0,036	0,128
107	0,410	0,298	0,455	0,029	0,199	0,324	0,040	0,777
108	0,237	0,198	0,268	0,596	0,114	0,144	0,036	0,413
109	0,246	0,215	0,262	0,028	0,108	0,144	0,037	0,806
110	0,281	0,153	0,156	0,007	0,222	0,846	0,038	0,615
111	0,364	0,441	0,296	0,008	0,365	1,000	0,044	0,242
112	0,325	0,135	0,051	0,009	0,317	1,349	0,048	0,005
113	0,101	0,109	0,092	0,007	0,036	0,263	0,036	0,048
114	0,222	0,194	0,210	0,007	0,246	0,609	0,041	0,073
115	0,450	0,333	0,398	0,008	0,319	0,267	0,045	0,601
118	0,507	0,475	0,611	0,057	0,361	0,369	0,049	1,230
119	0,656	0,760	0,679	0,007	0,407	0,520	0,045	1,431
120	0,180	0,105	0,210	0,007	0,072	0,028	0,036	0,124
121	0,807	1,187	1,086	1,809	0,502	0,500	0,056	2,592
122	0,465	0,881	0,378	0,277	0,334	0,387	0,038	0,727
124	0,220	0,230	0,235	0,156	0,125	0,126	0,035	0,364
125	0,339	0,297	0,253	0,007	0,203	0,251	0,036	0,344
126	0,836	0,718	0,838	0,007	0,527	0,568	0,045	0,711
129	0,552	0,660	0,406	0,007	0,260	0,224	0,040	0,412
130	0,577	0,496	0,334	0,006	0,440	0,357	0,044	0,655
131	0,256	0,098	0,186	0,006	0,317	0,164	0,047	0,428
132	0,218	0,003	0,002	0,007	0,184	0,019	0,049	0,004
133	0,206	0,003	0,374	0,006	0,095	0,001	0,042	0,054

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
65	0,043	0,446	0,530	1,012	0,411	0,623	0,348	0,011
66	0,120	0,379	0,222	0,304	0,175	0,220	0,104	1,295
67	0,013	0,309	0,204	0,118	0,267	0,249	0,103	0,287
68	0,013	0,002	0,093	0,006	0,015	0,005	0,015	0,008
69	0,013	0,002	0,114	0,006	0,004	0,104	0,002	0,008
70	0,013	0,078	0,316	0,627	0,033	0,076	0,029	0,188
71	0,013	0,124	0,099	0,093	0,011	0,147	0,051	0,016
72	0,013	0,631	0,190	1,565	0,004	0,096	0,049	0,023
74	0,120	0,249	0,242	0,124	0,004	0,079	0,057	0,387
76	0,184	0,307	0,464	1,000	0,040	0,257	0,002	0,539
77	0,013	0,218	0,164	0,360	0,004	0,003	0,002	0,046
78	0,013	0,005	0,175	0,006	0,004	0,003	0,002	0,053
80	0,054	0,242	0,067	0,007	0,037	0,107	0,005	0,173
81	0,837	0,902	0,561	0,007	0,348	0,569	0,866	0,656
82	0,111	0,118	0,215	0,007	0,205	0,177	0,194	0,180
83	0,384	0,321	0,471	0,006	0,571	0,421	0,222	0,491
84	0,323	0,012	0,005	0,007	0,006	0,004	0,005	0,599
85	0,013	0,297	0,354	0,007	0,124	0,367	0,315	0,545
86	0,013	0,151	0,005	0,007	0,006	0,004	0,005	0,340
88	0,013	0,415	0,220	0,007	0,006	0,280	0,431	0,658
89	0,013	0,178	0,126	0,007	0,006	0,054	0,097	0,424
90	0,013	0,017	0,388	0,494	0,468	0,467	0,254	0,113
91	0,013	0,243	0,441	0,011	0,428	0,375	0,325	0,407
92	0,012	0,156	0,319	0,752	0,348	0,474	0,149	0,193
93	0,013	0,116	0,388	0,370	0,229	0,240	0,092	4,004
94	0,102	0,002	0,005	0,012	0,010	0,006	0,004	0,690
95	0,280	0,079	0,154	0,011	0,448	0,154	0,041	0,628
96	0,083	0,271	0,170	0,101	0,159	0,215	0,078	0,709
97	0,265	0,321	0,218	0,011	0,010	0,006	0,003	0,822
98	0,304	0,229	0,297	0,011	0,299	0,191	0,047	0,766
99	0,006	0,052	0,003	0,008	0,006	0,603	0,004	0,009
100	0,928	0,357	0,003	0,008	0,243	0,003	0,004	1,088
102	0,083	0,304	0,058	0,232	0,238	0,070	0,054	0,298
103	0,013	0,013	0,040	0,312	0,151	0,028	0,041	0,008
104	0,018	0,018	0,003	0,008	0,005	0,003	0,004	0,399
107	0,238	0,140	0,069	0,094	0,124	0,225	0,014	0,385
108	0,044	0,049	0,074	0,094	0,059	0,170	0,034	0,266
109	0,021	0,073	0,055	0,007	0,249	0,003	0,003	0,266
110	0,008	0,131	0,034	0,051	0,314	0,022	0,017	0,293
111	0,008	0,196	0,786	0,847	0,821	0,790	0,524	0,514
112	0,009	0,067	0,681	0,794	0,787	3,918	0,674	0,010
113	0,008	0,007	0,269	0,009	0,008	0,074	0,098	0,204
114	0,008	0,106	0,297	0,009	0,335	0,111	0,228	0,160
115	0,013	0,365	0,137	0,010	0,009	0,321	0,350	0,451
118	0,363	0,513	0,676	0,009	0,963	0,698	0,370	15,081
119	0,437	0,623	0,840	0,642	1,633	1,030	0,819	0,902
120	0,013	0,015	0,439	0,027	0,293	0,148	0,100	0,419
121	0,376	0,784	1,610	1,320	2,010	1,281	1,098	13,823
122	0,266	0,255	0,013	0,072	0,532	0,437	0,372	0,624
124	0,297	0,142	0,078	0,007	0,087	0,082	0,122	0,246
125	0,156	0,203	0,156	0,007	0,013	0,192	0,070	0,808
126	0,030	0,536	1,432	0,565	1,348	0,845	0,622	0,470
129	0,216	0,181	0,143	0,007	0,334	0,309	0,227	0,524
130	0,183	0,340	0,013	0,008	0,013	0,047	0,171	1,107
131	0,171	0,183	0,247	0,007	0,829	0,612	0,250	0,495
132	0,013	0,112	0,273	0,181	0,705	0,554	0,354	0,009
133	0,013	0,105	0,013	0,008	0,013	0,297	0,003	0,008

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
134	0,309	0,159	0,116	0,006	0,218	0,139	0,044	0,231
135	0,523	0,485	0,316	0,006	0,327	0,218	0,053	0,482
136	0,363	0,275	0,156	0,006	0,165	0,201	0,039	0,394
137	0,178	0,133	0,289	1,383	0,073	0,175	0,037	0,504
138	0,225	0,203	0,210	0,005	0,146	0,157	0,042	0,529
139	0,177	0,304	0,243	0,005	0,096	0,237	0,038	0,668
140	0,218	0,437	0,181	0,245	0,107	0,133	0,041	0,664
141	0,201	0,039	0,003	0,021	0,066	0,120	0,040	0,004
142	0,542	0,524	0,338	0,021	0,488	0,404	0,043	0,706
143	0,437	0,491	0,519	0,020	0,333	0,288	0,045	0,572
144	0,659	0,619	0,669	0,023	0,406	0,355	0,055	0,881
145	0,153	0,057	0,053	0,021	0,042	0,002	0,038	0,004
146	0,130	0,094	0,072	1,457	0,105	0,382	0,039	0,279
147	0,119	0,290	0,240	0,066	0,140	0,371	0,044	0,540
148	0,049	0,020	0,002	0,009	0,050	0,052	0,037	0,003
149	0,086	0,263	0,314	0,173	0,099	0,229	0,037	0,141
150	0,105	0,118	0,177	0,008	0,045	0,152	0,035	0,265
152	0,002	0,005	0,008	0,052	0,000	0,001	0,044	0,005
153	0,070	0,004	0,020	0,044	0,071	0,098	0,040	0,197
156	0,352	0,105	0,007	0,049	0,153	0,099	0,044	0,201
157	0,272	0,004	0,007	0,048	0,123	0,116	0,046	0,730
158	0,072	0,004	0,007	0,049	0,061	0,019	0,042	0,051
159	0,186	0,010	0,006	0,008	0,001	0,003	0,041	0,006
161	1,558	1,074	0,559	0,009	0,335	0,314	0,061	0,508
162	0,995	0,466	0,153	0,008	0,228	0,081	0,044	0,006
163	0,005	0,011	0,006	0,009	0,001	0,003	0,043	0,007
164	1,224	0,941	0,322	0,008	0,249	0,228	0,048	0,372
165	0,535	0,440	0,115	0,099	0,200	0,265	0,039	0,433
166	0,313	0,216	0,006	0,008	0,116	0,093	0,038	0,121
167	0,532	0,528	0,271	0,007	0,260	0,196	0,039	0,284
168	1,508	1,312	0,616	0,008	0,543	0,466	0,053	1,294
169	0,172	0,242	0,006	0,007	0,054	0,139	0,036	0,005
170	0,157	0,003	0,004	0,009	0,014	0,005	0,051	0,005
172	0,184	0,002	0,004	0,008	0,054	0,005	0,037	0,000
173	0,280	0,070	0,022	0,007	0,155	0,159	0,036	0,335
174	0,517	0,151	0,124	0,007	0,135	0,178	0,039	0,422
178	0,253	0,002	0,004	0,008	0,098	0,005	0,041	0,005
179	0,163	0,005	0,012	0,009	0,161	0,003	0,050	0,006
180	0,346	0,207	0,489	0,007	0,247	0,228	0,045	0,311
181	0,128	0,004	0,011	0,008	0,061	0,089	0,037	0,005
182	0,403	0,144	0,280	0,007	0,458	0,196	0,048	0,898
183	0,622	0,338	0,130	0,008	0,163	0,434	0,045	1,454
184	0,213	0,003	0,005	0,038	0,187	0,046	0,036	0,004
185	0,413	0,299	0,429	0,109	0,307	0,234	0,037	0,414
186	0,555	0,445	0,578	0,328	0,437	0,279	0,040	0,414
187	0,587	0,586	0,924	0,693	0,383	0,231	0,043	0,637
188	0,581	0,278	0,563	0,040	0,490	0,313	0,043	0,322
189	0,465	0,128	0,155	0,041	0,409	0,243	0,045	0,351
190	0,675	0,799	0,513	0,243	0,285	0,349	0,057	0,242
191	0,741	0,809	0,645	0,261	0,352	0,377	0,033	0,113
192	0,693	0,759	0,435	0,226	0,270	0,355	0,058	0,293
193	0,400	0,630	0,359	0,225	0,255	0,270	0,032	0,190
196	0,648	0,665	0,356	0,203	0,276	0,322	0,050	0,004
197	0,444	0,391	0,196	0,157	0,153	0,205	0,044	0,004
198	0,214	0,216	0,074	0,045	0,017	0,089	0,039	0,551
199	0,461	0,846	0,623	0,114	0,204	0,390	0,045	0,563
200	0,794	0,875	0,615	0,169	0,215	0,386	0,045	0,551

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
134	0,013	0,172	0,135	0,008	0,015	0,400	0,127	0,016
135	0,038	0,422	0,009	0,008	0,008	0,028	0,077	1,013
136	0,013	0,167	0,083	0,008	0,008	0,004	0,003	0,531
137	0,100	0,190	0,231	0,008	0,100	0,117	0,009	0,272
138	0,044	0,199	0,004	0,008	0,008	0,008	0,003	0,640
139	0,023	0,253	0,096	0,008	0,008	0,004	0,003	0,245
140	0,013	0,264	0,031	0,008	0,008	0,008	0,056	0,755
141	0,013	0,001	0,109	0,008	0,008	0,004	0,003	0,008
142	0,193	0,320	0,296	0,008	0,215	0,343	0,547	0,518
143	0,110	0,308	0,283	0,181	0,330	0,373	0,651	0,408
144	0,377	0,500	0,309	0,007	0,076	0,331	0,302	0,581
145	0,013	0,001	0,005	0,007	0,006	0,036	0,027	0,055
146	0,013	0,105	0,161	0,080	0,054	0,178	0,207	0,007
147	0,033	0,154	0,005	0,008	0,032	0,234	0,003	0,438
148	0,013	0,026	0,121	0,065	0,000	0,178	0,125	0,007
149	0,013	0,073	0,031	0,007	0,049	0,104	0,075	0,601
150	0,013	0,079	0,054	0,007	0,005	0,107	0,041	0,497
152	0,013	0,002	0,005	0,007	0,005	0,027	0,003	0,008
153	0,013	0,045	0,434	0,116	0,167	0,132	0,150	0,007
156	0,013	0,239	0,670	0,435	0,265	0,478	0,438	0,007
157	0,013	0,202	0,750	0,580	1,092	0,628	0,309	0,008
158	0,013	0,076	0,691	0,416	0,516	0,429	0,242	0,008
159	0,015	0,004	0,659	0,483	0,599	0,418	0,279	0,012
161	0,014	0,339	0,590	0,242	0,599	0,580	1,030	0,012
162	0,014	0,174	0,382	0,121	0,008	0,278	0,004	0,012
163	0,016	0,004	0,656	0,517	0,508	0,455	0,246	0,013
164	0,066	0,149	0,722	0,546	0,736	0,651	0,517	0,011
165	0,060	0,107	0,355	0,007	0,529	0,838	0,611	0,513
166	0,013	0,051	0,004	0,008	0,006	0,398	0,404	0,008
167	0,186	0,098	0,086	0,008	0,089	0,742	0,489	0,318
168	0,995	0,678	0,582	0,007	1,106	1,418	1,419	0,482
169	0,013	0,002	0,021	0,008	0,006	0,188	0,155	0,008
170	0,013	0,003	0,004	0,008	0,095	0,646	0,458	0,008
172	0,013	0,009	0,003	0,008	0,006	0,324	0,155	0,008
173	0,013	0,140	0,038	0,008	0,256	0,485	0,277	0,008
174	0,013	0,117	0,003	0,008	0,172	0,536	0,246	0,127
178	0,013	0,011	0,003	0,008	0,103	0,384	0,112	0,008
179	0,008	0,164	0,003	0,009	0,006	0,344	0,349	0,011
180	0,007	0,367	0,003	0,009	0,006	0,177	0,003	0,009
181	0,007	0,023	0,003	0,008	0,006	0,003	0,004	0,010
182	0,007	0,452	0,003	0,009	0,006	0,213	0,003	0,000
183	0,007	1,015	0,003	0,008	0,006	0,119	0,488	0,010
184	0,013	0,003	0,003	0,008	0,006	0,034	0,200	0,009
185	0,094	0,425	0,003	0,009	0,006	0,222	0,041	0,800
186	0,057	0,790	0,003	0,009	0,006	0,521	0,441	0,966
187	0,104	0,664	0,456	0,007	0,683	0,875	0,725	1,083
188	0,162	1,016	0,855	0,681	0,859	1,070	0,831	0,716
189	0,013	0,383	0,687	0,159	0,399	0,936	0,915	0,791
190	0,067	0,492	0,557	0,007	0,669	1,039	0,999	0,008
191	0,190	0,580	0,836	0,522	0,615	0,997	0,996	0,008
192	0,067	0,383	0,134	0,008	0,392	0,626	0,750	0,008
193	0,013	0,311	0,120	0,008	0,101	0,593	0,596	0,007
196	0,013	0,323	0,687	0,167	0,385	0,562	0,677	0,008
197	0,013	0,001	0,005	0,008	0,068	0,234	0,187	0,008
198	0,026	0,094	0,008	0,008	0,010	0,320	0,355	0,011
199	0,750	1,041	1,109	0,420	0,535	1,122	1,213	0,011
200	0,066	0,544	0,238	0,008	0,010	0,701	0,628	0,010

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
201	0,560	0,821	0,394	0,120	0,133	0,240	0,043	0,004
202	0,893	1,354	0,758	0,255	0,242	0,415	0,047	0,383
203	0,333	0,522	0,339	0,148	0,101	0,238	0,040	0,194
205	0,157	0,211	0,169	0,021	0,110	0,150	0,037	0,009
206	0,403	0,386	0,365	0,113	0,192	0,345	0,041	0,124
207	0,213	0,278	0,240	0,496	0,132	0,184	0,038	0,008
210	0,260	0,146	0,249	0,038	0,139	0,212	0,042	0,005
212	0,210	0,316	0,447	0,003	0,152	0,293	0,043	0,179
214	0,202	0,535	0,521	0,238	0,149	0,325	0,038	0,153
215	0,128	0,427	0,299	0,100	0,134	0,189	0,040	0,005
216	0,251	0,772	0,774	0,393	0,309	0,641	0,046	0,005
217	0,376	0,876	0,794	0,345	0,353	0,606	0,051	0,005
218	1,091	0,922	1,008	0,568	0,502	0,663	0,047	1,197
219	0,927	0,520	0,742	0,314	0,501	0,478	0,049	0,305
220	0,522	0,474	0,420	0,229	0,173	0,280	0,041	0,416
221	0,486	0,483	0,578	0,286	0,223	0,268	0,044	0,771
223	0,935	0,879	0,872	0,546	0,332	0,479	0,058	0,006
224	0,759	0,779	0,591	0,507	0,254	0,463	0,038	0,582
225	0,012	0,004	0,002	0,008	0,001	0,002	0,048	0,021
226	0,208	0,365	0,104	0,007	0,195	0,201	0,042	0,019
227	1,240	0,608	0,323	0,865	0,247	0,333	0,043	2,099
228	4,052	2,237	0,723	1,277	0,787	0,979	0,056	0,235
229	2,708	0,334	0,167	0,007	0,161	0,230	0,043	0,020
230	2,333	1,275	0,574	0,943	0,481	0,540	0,046	0,019
231	0,008	0,005	0,006	0,008	0,001	0,004	0,041	0,019
232	1,076	1,163	0,966	0,695	0,340	0,552	0,045	0,018
235	1,068	1,229	0,996	0,461	0,444	0,707	0,040	0,266
236	0,462	0,369	0,416	0,050	0,116	0,346	0,037	0,018
237	0,523	0,743	0,660	0,525	0,255	0,472	0,042	0,019
238	0,008	0,005	0,031	0,227	0,083	0,480	0,046	0,018
240	0,005	0,010	0,006	0,002	0,051	0,095	0,038	0,013
241	0,093	0,196	0,209	0,094	0,047	0,111	0,037	0,012
244	0,005	0,005	0,006	0,002	0,001	0,001	0,039	0,013
245	0,632	0,905	0,701	0,371	0,322	0,288	0,038	0,623
246	0,265	0,347	0,350	0,242	0,149	0,187	0,041	0,000
247	0,720	0,983	0,842	0,470	0,366	0,388	0,043	0,348
248	0,003	0,004	0,002	0,004	0,061	0,020	0,040	0,008
249	0,691	0,840	0,503	0,493	0,331	0,442	0,044	0,966
253	0,003	0,005	0,605	0,003	0,139	0,001	5,885	0,514
254	0,004	0,005	0,842	0,004	0,001	0,002	0,027	0,495
255	0,003	0,005	0,362	0,075	0,008	0,158	3,488	0,005
256	0,003	0,005	0,006	0,004	0,001	0,002	0,026	0,005
257	0,003	0,005	0,079	0,226	0,082	0,103	1,550	0,005
259	0,003	0,004	0,158	0,115	0,124	0,001	0,781	0,032
260	0,003	0,005	0,035	0,013	0,002	0,001	0,032	0,003
261	0,003	0,004	0,035	0,067	0,028	0,011	1,594	0,012
262	0,003	0,005	0,017	0,080	0,002	0,001	0,032	0,003
263	0,003	0,794	0,384	0,617	0,219	0,044	1,500	0,465
264	0,003	0,005	0,055	0,404	0,002	0,002	0,035	0,003
266	0,003	0,004	0,085	0,011	0,079	0,001	0,368	0,123
267	0,003	0,592	0,006	0,012	0,013	0,003	0,576	0,038
270	0,003	0,080	0,209	0,011	0,107	0,010	0,384	0,357
271	0,003	1,269	0,209	0,362	0,162	0,042	0,080	0,588
273	0,004	0,286	0,497	0,011	0,001	0,002	0,408	0,222
274	0,054	0,008	0,164	0,008	0,103	0,002	0,035	0,003
275	0,001	0,793	0,075	0,008	0,099	0,002	0,036	0,249
276	0,107	0,010	0,224	0,008	0,071	0,002	0,039	0,003

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
201	0,014	0,003	0,008	0,008	0,010	0,323	0,550	0,011
202	0,014	0,097	0,190	0,008	0,010	0,662	0,948	0,186
203	0,013	0,165	0,009	0,008	0,010	0,027	0,066	0,010
205	0,013	0,000	0,008	2,543	0,010	0,218	0,261	0,010
206	0,566	0,396	0,009	0,008	0,011	0,004	0,152	0,010
207	0,158	0,124	0,017	0,008	0,107	0,377	0,201	0,010
210	0,013	0,057	0,006	0,008	0,007	0,289	0,112	0,055
212	0,053	0,356	0,159	0,008	0,207	0,498	0,537	0,008
214	0,090	0,132	0,097	0,008	0,129	0,666	0,997	0,078
215	0,013	0,078	0,006	0,008	0,007	0,100	0,293	0,280
216	0,264	0,413	0,125	0,008	0,007	0,545	0,915	0,008
217	0,068	0,869	1,019	0,007	0,722	1,164	2,028	0,008
218	0,544	0,519	0,006	0,011	0,007	0,004	0,003	0,280
219	0,013	0,546	0,610	0,330	0,173	0,447	0,207	0,009
220	0,078	0,180	0,043	0,009	0,006	0,169	0,099	0,009
221	0,022	0,218	0,106	0,009	0,070	0,315	0,041	0,009
223	0,013	0,451	0,466	0,009	0,416	0,388	0,350	0,042
224	0,350	0,276	0,812	1,115	0,805	0,587	0,399	0,093
225	0,016	0,009	0,274	0,294	0,168	0,268	0,168	0,011
226	0,015	0,008	0,192	0,098	0,157	0,268	0,073	0,011
227	0,014	0,456	0,120	0,009	0,141	0,298	0,099	0,470
228	2,237	2,349	0,951	1,514	1,138	1,050	1,242	1,165
229	0,015	0,008	0,137	0,010	0,131	0,189	0,052	0,098
230	0,014	0,196	0,397	0,205	0,340	0,627	0,403	0,519
231	0,014	0,008	0,222	0,307	0,203	0,308	0,235	0,019
232	0,014	0,267	0,360	0,153	0,268	0,518	0,354	0,019
235	0,013	0,558	0,620	0,655	0,628	0,607	0,548	0,019
236	0,014	0,016	0,251	0,143	0,307	0,346	0,257	0,019
237	0,014	0,008	0,005	0,011	0,007	0,219	0,004	0,019
238	0,014	0,031	0,005	0,011	0,007	0,246	0,004	0,018
240	0,014	0,005	0,103	0,007	0,059	0,213	0,115	0,019
241	0,013	0,005	0,022	0,007	0,005	0,104	0,136	0,018
244	0,014	0,005	0,005	0,009	0,006	0,003	0,004	0,019
245	0,671	0,372	0,108	0,008	0,005	0,293	0,173	0,018
246	0,013	0,086	0,005	0,008	0,006	0,053	0,003	1,211
247	1,237	0,386	0,404	0,109	0,007	0,429	0,380	0,018
248	0,005	0,003	0,368	0,065	0,297	0,429	0,237	0,014
249	0,162	0,473	0,175	0,008	0,308	0,506	0,651	1,756
253	0,013	0,001	0,233	0,012	0,594	0,513	0,397	0,012
254	0,013	0,001	0,303	0,460	0,822	0,664	0,481	0,012
255	0,013	0,001	0,331	0,153	0,567	0,507	0,365	0,013
256	0,013	0,001	0,382	0,012	1,029	0,772	0,241	10,059
257	0,013	0,001	0,387	0,012	0,514	0,569	0,362	0,013
259	0,014	0,001	0,224	0,024	0,106	0,147	0,034	0,011
260	0,014	0,001	0,061	0,012	0,090	0,180	0,130	0,011
261	0,013	0,001	0,061	0,012	0,186	0,343	0,230	0,010
262	0,014	0,001	0,277	0,141	0,201	0,274	0,235	0,011
263	0,015	0,001	0,049	0,003	0,029	0,193	0,076	0,013
264	0,016	0,001	0,003	0,004	0,050	0,079	0,002	0,012
266	0,014	0,039	0,306	0,302	0,368	0,496	0,324	0,033
267	0,368	0,073	0,229	0,123	0,255	0,331	0,112	2,063
270	0,014	0,206	0,114	0,075	0,100	0,169	0,202	0,032
271	1,316	0,364	0,089	0,055	0,059	0,226	0,216	0,032
273	2,671	0,002	0,003	0,004	0,005	0,002	0,002	0,031
274	0,013	0,003	0,003	0,004	0,004	0,140	0,002	0,012
275	1,118	0,026	0,148	0,445	0,345	0,577	0,712	0,014
276	0,015	0,003	0,004	0,582	0,005	0,107	0,413	0,014

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
277	0,178	1,610	0,126	0,008	0,211	0,002	0,035	0,003
279	0,196	0,009	0,332	0,008	0,257	0,002	0,039	0,004
280	0,003	0,003	0,008	0,002	0,001	0,002	0,038	0,010
281	0,578	0,251	0,282	0,145	0,179	0,002	0,034	0,009
282	0,172	0,003	0,087	0,002	0,024	0,002	0,034	0,008
283	0,350	0,280	0,237	0,142	0,098	0,001	0,032	0,154
284	0,003	0,227	0,203	0,079	0,069	0,002	0,036	0,008
288	0,004	0,034	0,013	0,010	0,264	0,002	0,067	0,027
289	0,004	0,005	0,002	0,009	0,002	0,002	0,063	0,024
291	0,145	0,005	0,002	0,009	0,002	0,002	0,063	0,023
292	0,475	0,005	0,032	0,008	0,002	0,002	2,218	0,021
293	0,004	0,005	0,002	0,008	0,078	0,002	0,060	0,021
294	0,003	0,005	0,616	0,360	0,047	0,863	5,921	0,111
295	0,003	0,004	2,407	0,490	0,255	1,319	3,677	0,862
296	0,003	0,005	0,006	0,002	0,001	0,230	0,050	0,014
297	0,003	0,005	1,994	1,234	0,296	2,391	8,595	1,460
298	0,066	0,168	0,864	1,483	0,405	2,794	12,702	2,961
299	0,004	0,227	0,531	0,996	0,345	1,549	7,067	1,612
300	0,004	0,006	0,007	0,010	0,001	0,002	0,040	0,003
301	0,004	0,006	0,008	0,009	0,001	0,022	0,039	0,004
302	0,003	0,005	0,007	0,008	0,008	0,172	0,033	0,164
303	0,004	0,006	0,007	0,010	0,001	0,002	0,040	0,003
307	0,004	0,008	0,215	0,730	0,002	0,030	0,375	0,183
308	0,731	0,008	0,672	3,163	0,238	0,001	4,125	0,003
309	1,101	0,008	0,751	3,801	0,372	0,001	0,031	0,047
310	0,476	0,008	0,192	3,106	0,155	0,002	0,034	0,050
311	1,633	0,771	1,017	5,390	0,441	0,069	1,031	0,046
312	0,176	0,008	0,102	3,277	0,002	0,002	0,033	0,050
313	0,333	0,005	1,186	0,241	0,100	0,499	2,063	0,067
315	0,512	0,005	0,983	0,553	0,192	0,505	2,094	0,137
316	0,146	0,005	0,904	0,007	0,004	0,541	4,031	0,003
318	0,017	0,006	0,220	0,007	0,131	0,370	0,033	0,003
319	0,052	0,005	0,147	0,007	0,127	0,272	3,656	0,003
322	0,005	0,007	0,009	0,008	0,042	0,020	0,034	0,008
323	0,005	0,007	0,009	0,008	0,052	0,020	0,034	0,064
324	0,489	0,008	0,009	0,009	0,207	0,496	0,037	0,981
325	0,430	0,009	0,010	0,010	0,172	0,021	0,043	0,008
326	0,075	0,007	0,009	0,008	0,048	0,020	0,033	0,028
327	0,005	0,007	0,009	0,008	0,016	0,020	0,035	0,008
328	0,004	0,006	0,007	0,010	0,001	0,002	0,041	0,197
329	0,003	0,005	0,006	0,009	0,001	0,002	0,040	0,190
330	0,003	0,004	0,007	0,009	0,056	0,002	0,040	0,198
332	0,003	0,005	0,007	0,010	0,001	0,002	0,043	0,209
333	0,004	0,006	0,008	0,010	0,001	0,002	0,046	0,210
334	0,003	0,005	0,007	0,010	0,001	0,002	0,039	0,168
335	0,003	0,005	0,007	0,009	0,028	0,002	0,039	0,003
337	0,003	0,005	0,007	0,010	0,001	0,002	0,047	0,004
338	0,003	0,005	0,006	0,010	0,001	0,002	0,046	0,004
339	0,003	3,731	0,008	0,011	0,071	0,002	0,049	0,003
340	0,003	0,005	0,007	0,011	0,059	0,002	0,047	0,004
342	0,003	0,005	0,006	0,008	0,296	0,001	0,000	1,899
343	0,091	0,005	0,006	0,007	0,377	0,006	0,033	1,120
346	0,003	0,005	0,006	0,008	0,003	0,002	0,000	1,077
347	0,003	0,005	0,007	0,008	0,065	0,002	0,038	0,007
349	0,003	0,005	0,006	0,008	0,590	0,002	0,040	1,454
350	0,114	0,003	0,186	0,003	0,228	0,253	1,085	0,821
351	0,004	0,003	0,099	0,109	0,104	0,141	0,013	0,101

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
277	0,014	0,003	0,030	0,465	0,104	0,275	0,425	0,013
279	1,474	0,003	0,004	0,195	0,089	0,171	0,280	0,014
280	0,016	0,013	0,333	0,996	0,564	0,598	0,839	0,016
281	0,014	0,011	0,329	0,395	0,355	0,430	0,532	0,013
282	0,015	0,011	0,085	0,539	0,094	0,204	0,253	0,013
283	0,013	0,167	0,004	0,175	0,157	0,119	0,117	0,012
284	0,014	0,011	0,004	0,164	0,042	0,119	0,139	0,012
288	0,019	0,012	0,003	0,002	0,005	0,003	0,003	0,015
289	0,016	0,011	0,045	0,184	0,039	0,145	0,161	0,015
291	0,016	0,013	0,106	0,901	0,200	0,252	0,374	0,016
292	0,014	0,012	0,003	0,369	0,004	0,065	0,016	0,016
293	0,015	0,012	0,008	0,148	0,004	0,009	0,029	0,015
294	0,014	0,008	0,034	0,888	0,116	0,273	0,276	0,017
295	0,014	0,007	0,003	0,303	0,000	0,089	0,244	0,017
296	0,016	0,008	0,132	0,326	0,135	0,219	0,364	0,016
297	0,014	0,349	0,003	0,371	0,005	0,147	0,248	0,018
298	1,421	1,294	0,003	0,949	0,005	0,136	0,411	0,017
299	0,579	0,850	0,081	0,342	0,005	0,219	0,248	0,015
300	0,016	0,001	0,003	0,008	0,005	0,016	0,038	0,013
301	0,016	0,002	0,135	0,200	0,005	0,264	0,239	0,017
302	0,014	0,001	0,166	0,174	0,119	0,153	0,378	0,012
303	0,017	0,001	0,003	0,184	0,005	0,047	0,262	0,014
307	0,014	0,001	0,186	1,384	0,138	0,169	1,470	0,030
308	2,158	0,031	0,302	0,793	0,340	0,301	0,352	0,031
309	0,618	0,001	0,203	1,138	0,251	0,315	0,378	0,033
310	0,014	0,001	0,333	0,843	0,408	0,420	0,523	0,034
311	0,039	0,003	0,415	1,347	0,462	0,366	0,460	0,034
312	0,013	0,001	0,212	0,712	0,319	0,366	0,289	0,034
313	0,500	0,001	0,005	0,573	0,279	0,240	0,260	0,013
315	0,553	0,001	0,320	1,002	0,516	0,501	0,571	0,012
316	0,015	0,001	0,153	0,879	0,204	0,288	0,452	0,015
318	0,014	0,001	0,104	0,562	0,082	0,132	0,126	0,013
319	0,015	0,001	0,081	0,448	0,007	0,091	0,185	0,013
322	0,015	0,004	0,004	0,002	0,008	0,005	0,004	0,007
323	0,013	0,004	0,004	0,046	0,008	0,330	0,004	9,865
324	1,737	0,044	0,004	0,037	0,008	0,005	0,004	0,006
325	0,015	0,004	0,005	0,002	0,008	0,005	0,004	0,007
326	0,014	0,004	0,005	0,002	0,008	0,005	0,004	0,006
327	0,015	0,004	0,004	1,018	0,008	0,378	0,321	0,006
328	0,018	0,001	0,000	0,784	0,008	0,005	0,000	0,014
329	0,017	0,001	0,004	0,201	0,008	0,136	0,004	0,013
330	0,016	0,001	0,004	0,847	0,399	0,489	0,292	0,014
332	0,017	0,001	0,003	0,004	0,004	0,003	0,002	0,016
333	0,019	0,002	0,003	0,003	0,004	0,002	0,002	0,016
334	0,017	0,001	0,003	0,003	0,004	0,044	0,082	0,015
335	0,016	0,001	0,003	0,003	0,004	0,002	0,002	0,015
337	0,019	0,001	0,263	0,033	0,320	0,261	0,310	0,018
338	0,017	0,001	0,325	0,185	0,297	0,226	0,165	0,018
339	1,092	0,001	0,162	0,018	0,137	0,150	0,128	0,015
340	0,020	0,002	0,498	0,257	0,500	0,418	0,367	0,018
342	0,014	0,000	0,534	0,632	0,362	0,151	0,219	0,287
343	0,014	0,001	0,897	1,249	0,680	0,404	0,587	0,009
346	0,014	0,001	0,740	0,577	0,526	0,308	0,034	0,009
347	0,015	0,001	0,408	0,514	0,446	0,381	0,300	0,009
349	0,039	0,059	1,076	1,399	0,495	0,454	0,593	0,009
350	0,013	0,003	0,641	0,862	0,861	0,710	0,637	0,255
351	0,083	0,003	0,005	0,008	0,005	0,003	0,063	0,362

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
353	0,004	0,003	0,002	0,003	0,087	0,016	0,014	0,003
354	0,004	0,003	0,130	0,003	0,063	0,062	0,014	0,004
355	0,004	0,003	0,002	0,003	0,053	0,012	0,012	0,128
357	0,041	0,005	0,037	0,007	0,113	0,311	1,105	0,080
358	0,226	0,007	0,006	0,008	0,141	0,633	0,138	0,160
359	0,077	0,005	0,006	0,007	0,164	0,212	0,129	0,070
360	0,039	0,005	0,006	0,007	0,030	0,005	0,126	0,003
361	0,003	0,006	0,006	0,008	0,002	0,005	0,133	0,003
362	0,003	0,006	0,007	0,008	0,151	0,227	0,139	0,003
364	0,003	0,223	0,006	0,008	0,009	0,175	0,036	0,005
365	0,003	0,014	0,006	0,008	0,002	0,021	0,034	0,004
366	0,003	0,015	0,009	0,008	0,157	0,131	0,037	0,004
367	0,003	0,015	0,006	0,008	0,320	0,002	0,041	0,005
371	0,804	0,094	0,267	0,007	0,223	0,029	0,096	0,272
373	0,365	0,007	0,093	0,007	0,124	0,052	0,093	0,164
374	0,405	0,008	0,049	0,007	0,135	0,080	0,094	0,320
375	0,442	0,008	0,354	0,008	0,232	0,065	0,099	0,488
376	0,321	0,009	0,006	0,009	0,236	0,001	0,115	0,416
378	0,330	0,006	0,006	0,008	0,056	0,006	0,024	0,005
379	0,419	0,006	0,006	0,008	0,163	0,091	0,666	0,824
380	0,380	0,006	0,006	0,008	0,165	0,224	5,117	1,937
382	0,122	0,006	0,006	0,008	0,097	0,006	0,025	0,005
384	0,076	0,006	0,006	0,008	0,057	0,006	0,024	0,005
385	0,003	0,007	0,006	0,008	0,078	0,006	0,024	0,332
392	0,006	0,011	7,373	11,468	0,182	0,315	0,032	0,999
395	0,237	0,122	0,237	1,121	0,156	0,418	0,033	0,146
396	0,482	0,567	0,006	0,170	0,130	0,238	0,036	0,050
397	2,366	0,004	0,007	0,113	0,244	0,267	0,038	0,003
398	0,601	0,004	0,007	0,447	0,245	0,258	0,042	0,275
399	0,510	0,134	0,006	0,518	0,204	0,392	0,037	0,298
400	1,281	0,403	0,006	0,809	0,258	0,426	0,036	0,500
401	0,012	0,218	0,007	3,000	0,202	0,332	0,044	0,018
402	0,012	4,238	0,007	1,468	0,217	0,001	0,038	0,020
403	1,333	0,189	0,006	1,965	0,227	0,303	0,037	0,017
405	0,862	0,167	0,008	3,496	0,224	0,279	0,048	0,019
406	0,080	0,008	0,006	1,397	0,106	0,155	0,036	0,018
408	1,149	0,306	0,007	0,008	0,329	0,629	0,039	0,018
409	0,794	0,006	0,006	0,007	0,244	0,371	0,032	2,391
410	0,004	0,028	0,006	0,213	0,151	0,135	0,035	0,013
411	3,140	1,564	0,429	0,227	0,001	3,532	0,042	2,263
412	0,278	0,006	0,006	0,135	0,186	0,661	0,036	0,013
413	0,003	0,006	0,006	0,007	0,076	0,112	0,037	0,014
414	0,533	0,006	0,006	0,447	0,266	0,808	0,036	0,716
415	0,124	0,612	0,210	0,024	0,125	0,082	0,045	0,005
418	1,081	0,877	0,010	0,313	0,273	0,442	0,043	0,799
419	0,997	1,129	0,011	0,245	0,278	0,389	0,051	0,459
421	0,706	0,287	0,010	0,273	0,215	0,312	0,045	0,170
424	0,229	0,008	0,010	0,032	0,141	0,002	0,034	0,009
426	0,003	0,008	0,011	0,032	0,050	0,002	0,034	0,010
427	0,238	0,007	0,348	0,029	0,160	0,140	0,031	0,018
430	0,256	0,007	0,657	0,029	0,115	0,071	0,034	0,009
431	1,071	0,007	0,010	1,248	0,166	0,348	0,036	0,633
432	0,121	0,514	0,006	0,008	0,190	0,380	0,038	0,029
433	0,003	0,005	0,007	0,009	0,014	0,177	0,042	0,032
434	0,000	0,005	0,008	0,010	0,186	0,223	0,046	0,036
438	0,003	0,059	0,007	0,009	0,144	0,317	0,043	0,034
440	0,004	0,005	0,010	0,012	0,081	0,237	0,052	0,032

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
353	0,013	0,004	0,005	0,009	0,004	0,222	0,274	0,006
354	0,013	0,004	0,005	0,008	0,004	0,188	0,198	0,006
355	0,013	0,004	0,004	0,008	0,305	0,334	0,308	0,006
357	0,014	0,002	0,219	0,048	0,166	0,107	0,092	0,209
358	0,015	0,001	0,003	0,003	0,007	0,011	0,002	0,549
359	0,014	0,001	0,182	0,014	0,389	0,305	0,163	0,017
360	0,014	0,001	0,499	0,358	0,596	0,434	0,483	0,009
361	0,014	0,001	0,082	0,003	0,142	0,115	0,071	16,137
362	0,015	0,001	0,003	0,003	0,004	0,002	0,002	0,009
364	0,016	0,004	0,127	0,039	0,159	0,122	0,113	0,009
365	0,014	0,004	0,003	0,003	0,004	0,002	0,002	0,009
366	0,014	0,004	0,003	0,003	0,003	0,002	0,002	0,009
367	0,016	0,004	0,181	0,043	0,542	0,099	0,066	0,009
371	0,014	0,008	0,065	0,002	0,167	0,099	0,053	0,009
373	0,013	0,356	0,122	0,066	0,254	0,214	0,115	0,189
374	0,724	0,443	0,268	0,132	0,372	0,300	0,267	0,009
375	0,013	0,291	0,402	0,251	0,560	0,410	0,327	0,318
376	0,015	0,008	0,003	0,002	0,070	0,040	0,056	0,010
378	0,015	0,004	0,022	0,002	0,010	0,011	0,002	0,009
379	0,013	0,055	0,595	0,004	0,004	0,003	0,509	0,000
380	2,039	0,739	0,004	0,004	0,004	0,003	0,003	0,008
382	0,015	0,004	0,004	0,004	0,004	0,022	0,003	0,009
384	0,014	0,004	0,004	0,004	0,059	0,067	0,122	0,009
385	0,016	0,004	0,134	0,073	0,185	0,258	0,352	0,009
392	0,015	0,001	0,109	0,113	0,389	0,253	0,136	1,279
395	0,015	0,177	0,058	0,009	0,088	0,086	0,058	0,011
396	0,014	0,185	0,004	0,026	0,075	0,061	0,028	0,011
397	0,015	0,454	0,225	0,352	0,636	0,415	0,367	0,012
398	0,017	0,415	0,004	0,005	0,018	0,002	0,002	0,013
399	0,015	0,393	0,200	0,109	0,309	0,223	0,136	0,012
400	0,014	0,688	0,450	0,517	0,508	0,385	0,300	0,012
401	0,017	0,001	0,341	0,939	0,367	0,375	0,463	0,017
402	0,018	0,001	0,005	0,006	0,006	0,003	0,003	0,020
403	0,014	0,001	0,149	0,191	0,225	0,248	0,168	0,017
405	0,018	0,001	0,431	0,390	0,584	0,527	0,200	5,598
406	0,645	0,001	0,004	0,005	0,005	0,003	0,003	0,016
408	0,016	0,001	0,077	0,005	0,128	0,162	0,132	0,018
409	0,015	0,001	0,008	0,005	0,005	0,030	0,003	0,014
410	0,014	0,001	0,004	0,005	0,005	0,003	0,003	0,012
411	5,132	0,001	0,007	0,007	0,007	0,005	0,005	0,014
412	0,014	0,001	0,027	0,005	0,067	0,093	0,022	0,013
413	0,015	0,001	0,004	0,005	0,005	0,003	0,003	0,013
414	0,342	0,001	0,004	0,005	0,005	0,060	0,003	0,012
415	4,223	0,001	0,004	0,005	0,005	0,004	0,004	0,010
418	0,845	0,412	0,605	0,468	0,725	0,541	0,481	0,011
419	0,645	0,336	0,004	0,132	0,516	0,418	0,329	0,012
421	0,016	0,305	0,327	0,317	0,296	0,357	0,241	0,011
424	0,037	0,004	0,116	0,033	0,249	0,305	0,198	0,016
426	0,039	0,004	0,025	0,003	0,004	0,011	0,000	0,016
427	0,035	0,159	0,011	0,003	0,040	0,077	0,053	0,015
430	0,036	0,004	0,004	0,003	0,004	0,049	0,003	0,015
431	0,035	0,219	0,684	0,366	0,549	0,396	0,263	0,016
432	0,015	0,001	0,679	0,538	0,790	0,579	0,447	0,019
433	0,016	0,001	0,004	0,003	0,077	0,017	0,006	0,018
434	0,017	0,001	0,796	0,604	0,783	0,596	0,519	0,023
438	0,017	0,001	0,615	0,460	0,556	0,401	0,362	0,021
440	0,018	0,002	1,062	0,939	1,226	0,942	0,982	0,020

Soro	Bel-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Bel-6	BR7-6
441	0,580	0,084	0,006	0,277	0,172	0,500	0,036	0,466
442	0,233	0,005	0,006	0,007	0,095	0,128	0,035	0,104
443	0,422	0,257	0,006	0,007	0,194	0,397	0,033	0,424
446	0,253	0,005	0,007	0,008	0,121	0,306	0,040	0,007
450	0,673	0,796	0,006	0,106	0,247	0,728	0,036	0,514
452	0,632	0,005	0,007	0,008	0,048	0,004	0,035	0,003
453	0,527	0,005	0,007	0,008	0,003	0,001	0,038	0,003
454	0,719	0,005	0,007	0,009	0,063	0,001	0,038	0,003
457	0,961	0,005	0,007	0,008	0,242	0,026	0,037	0,003
459	0,258	0,005	0,007	0,008	0,003	0,002	0,038	0,003
460	0,180	0,005	0,007	0,008	0,003	0,002	0,039	0,003
461	2,281	0,007	0,007	0,008	0,105	0,108	0,039	0,009
462	1,287	0,007	0,006	0,008	0,015	0,002	0,037	0,008
463	2,667	0,008	0,007	0,008	0,053	0,110	0,039	0,008
465	1,620	0,007	0,006	0,008	0,040	0,023	0,037	0,008
466	0,007	0,008	0,008	0,009	0,160	0,085	0,041	1,903
477	1,390	0,475	0,418	0,362	0,193	0,201	0,500	0,830
478	1,971	0,452	0,141	0,440	0,328	0,389	0,281	1,254
479	2,390	0,181	0,006	0,050	0,313	0,470	0,034	0,332
504	1,914	0,060	0,034	0,007	0,188	0,209	0,033	0,019
507	1,867	0,460	0,203	0,170	0,210	0,310	0,033	0,020
508	1,232	0,130	0,006	0,008	0,224	0,402	1,094	1,334
509	2,953	1,198	0,006	0,008	0,426	0,496	0,036	1,477
510	0,018	0,006	0,006	0,007	0,109	0,128	0,033	0,342
512	1,069	0,667	0,006	0,008	0,120	0,234	0,040	1,753
514	1,793	0,294	0,034	0,008	0,213	0,289	0,036	0,011
517	1,775	0,339	1,232	0,008	0,258	0,336	0,037	0,012
518	0,280	0,197	0,006	0,008	0,244	1,334	0,034	0,009
519	0,348	0,422	0,006	0,007	0,249	1,350	0,034	0,008
520	0,416	0,593	0,006	0,007	0,247	0,846	0,034	0,352
525	0,392	0,718	0,390	0,433	0,226	1,090	0,032	1,049
526	0,068	0,189	0,006	0,008	0,131	0,137	0,034	0,033
527	0,006	0,010	0,452	0,008	0,245	1,032	0,793	0,008
528	0,465	0,008	0,503	0,071	0,143	0,627	1,801	0,608
529	0,006	0,009	0,028	0,008	0,151	0,374	0,014	0,094
531	0,190	0,008	0,384	0,008	0,166	0,311	0,027	0,094
536	0,109	0,009	0,350	0,008	0,155	0,413	0,014	0,413
537	0,511	0,008	0,898	0,007	0,197	0,327	0,323	0,530
538	0,398	0,006	0,006	0,007	0,235	0,468	0,041	0,598
539	0,325	0,006	0,006	0,008	0,222	0,339	0,043	0,009
540	0,272	0,006	0,006	0,008	0,208	0,117	0,045	0,009

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	<i>MSP-1₁₉</i>
441	0,499	0,001	0,765	0,682	0,871	0,652	0,680	0,032
442	0,027	0,001	0,168	0,116	0,172	0,138	0,261	0,033
443	0,276	0,001	0,237	0,363	0,542	0,560	0,478	0,033
446	0,009	0,001	0,682	0,450	0,870	0,582	0,401	0,035
450	0,007	0,001	1,961	0,625	1,341	1,225	1,219	0,034
452	0,016	0,001	0,375	0,305	0,511	0,449	0,300	0,025
453	0,015	0,001	0,053	0,056	0,205	0,322	0,211	6,287
454	0,016	0,001	0,219	0,225	0,423	0,427	0,353	0,026
457	0,016	0,001	0,502	0,442	0,628	0,527	0,425	0,026
459	0,017	0,001	0,078	0,041	0,117	0,219	0,205	0,026
460	0,017	0,001	0,293	0,003	0,004	0,002	0,002	0,022
461	0,015	0,001	0,004	0,003	0,004	0,062	0,051	0,014
462	0,015	0,001	0,088	0,007	0,778	0,358	0,258	0,434
463	0,014	0,001	0,503	0,848	1,459	1,067	0,854	0,012
465	0,014	0,001	0,144	0,246	0,670	0,431	0,271	0,013
466	8,592	0,001	0,173	0,109	1,011	1,133	0,461	0,015
477	1,684	0,178	0,002	0,008	0,081	0,278	0,003	2,061
478	0,250	0,236	0,065	0,036	0,649	0,504	0,197	0,009
479	0,014	0,007	0,377	0,486	1,303	1,097	0,478	0,010
504	0,013	0,004	0,124	0,007	0,838	0,504	0,268	0,009
507	0,184	0,055	0,181	0,022	0,582	0,651	0,277	0,009
508	0,014	0,001	0,004	0,008	0,349	0,704	0,074	0,013
509	0,014	0,001	0,424	0,587	1,014	0,964	0,527	0,014
510	0,014	0,001	0,074	0,007	0,320	0,221	0,004	0,012
512	0,015	0,001	0,004	0,008	0,345	0,495	0,004	0,012
514	0,015	0,001	0,251	0,543	0,874	0,799	0,109	0,013
517	0,015	0,001	0,005	0,010	0,006	0,003	0,005	0,014
518	0,015	0,012	0,263	0,493	0,558	0,846	0,410	0,011
519	0,015	0,011	0,181	0,877	0,369	0,610	0,285	0,010
520	0,014	0,011	0,292	0,616	0,762	1,093	0,402	0,010
525	0,921	0,737	0,003	0,008	0,006	0,856	0,004	1,025
526	0,014	0,011	0,003	0,008	0,006	0,436	0,004	0,010
527	0,011	0,012	0,003	0,008	0,006	1,173	0,004	0,014
528	0,114	0,011	0,003	0,008	0,006	0,274	0,004	0,011
529	0,010	0,011	0,003	0,009	0,006	0,390	0,004	0,012
531	0,010	0,010	0,003	0,008	0,006	1,219	0,004	0,011
536	0,010	0,011	0,003	0,009	0,006	1,362	0,004	0,011
537	0,010	0,010	0,003	0,008	0,006	0,549	0,004	0,011
538	0,013	0,003	0,003	0,009	0,007	0,527	0,004	0,013
539	0,013	0,003	0,354	0,379	0,406	0,566	0,232	0,014
540	0,013	0,003	0,004	0,009	0,006	0,484	0,002	0,013

Resultados do ELISA para a determinação de anticorpos IgG e IgM contra os diferentes antígenos recombinantes dos blocos variáveis 2, 6 e 10 e da região conservada C-terminal (PvMSP1₁₉) da proteína de superfície do merozoíta (MSP1) de *P. vivax*. Os resultados são expressos em medianas dos índices de reatividade (IR) das 40 amostras de soro de indivíduos com malária vivax patente (T1).

Antígenos recombinantes da MSP1 de <i>P. Vivax</i>		Resultados ELISA	
		IgG	IgM
		IR (25% - 75%)	IR (25% - 75%)
região N- terminal da MSP-1	Belém-2	0,251 (0,929 -1,013)	0,246 (0,564 -0,651)
	BR7-2	0,389 (0,999 -1,160)	0,113 (0,665 -0,808)
	bloco 2 BP13-2	0,420 (0,924 -0,988)	0,009 (0,658 -0,746)
	BP29-2	0,291 (0,940 -1,073)	0,012 (0,673 -0,796)
	BP30-2	0,437 (0,772 -0,845)	0,148 (0,544 -0,646)
	BP39-2	0,379 (0,960 -1,034)	0,197 (0,581 -0,660)
	Belém-6	0,074 (0,869 -1,033)	0,041 (0,714 -0,864)
	bloco 6 BR7-6	0,241 (0,948 -1,007)	0,044 (0,670 -0,764)
	BP1-6	0,497 (0,927 -1,032)	0,016 (0,730 -0,823)
	BP39-6	0,185 (1,006 -1,139)	0,008 (0,708 -0,814)
	BR7-10	0,022 (1,041 -1,108)	0,119 (0,864 -1,106)
	bloco 10 BP1-10	0,040 (1,070 -1,309)	0,066 (0,698 -0,843)
	BP13-10	0,004 (1,004 -1,075)	0,228 (0,808 -0,927)
	BP29-10	0,202 (1,075 -1,290)	0,286 (0,796 -0,939)
	BP39-10	0,013 (1,166 -1,553)	0,227 (0,674 -0,833)
C-terminal	bloco 13 PvMSP1 ₁₉	3,795 (1,271 -1,866)	0,014 (0,808 -0,871)

IR= DO da amostra/ DO do "cut-off"

Resultados em IR do ELISA para a determinação de anticorpos IgG contra os antígenos recombinantes da PvMSP1 em amostras de soro colhidas de 40 indivíduos durante malária patente. As amostras dos colhidas no 2º, 3º e 4º episódios de malária são identificadas por T2, T3 e T4, respectivamente.

Soro	Belém-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Belém-6	BR7-6
40	0,932	1,050	0,892	0,941	0,833	0,985	0,859	1,000
61	0,947	1,054	0,925	0,899	0,846	0,978	0,809	0,949
122	1,117	1,207	1,092	1,156	0,809	1,126	0,886	0,961
122 (T2)	1,077	1,232	0,992	1,048	0,830	1,082	0,843	0,956
141	0,907	0,998	0,857	0,860	0,741	0,918	0,810	0,922
156	0,954	1,049	0,876	0,939	0,801	0,958	0,901	0,952
183	0,993	1,000	0,961	1,034	0,841	0,975	0,970	1,037
183 (T2)	1,139	1,264	1,071	1,188	1,046	1,205	1,112	1,288
187	0,926	0,991	0,955	0,950	0,809	0,959	0,858	0,975
212	0,967	1,007	0,963	0,958	0,807	0,946	1,000	0,933
220	1,269	1,445	1,208	1,348	1,127	1,340	1,227	1,326
248	1,193	1,350	1,114	1,209	1,049	1,250	1,054	1,281
264	1,117	1,316	1,073	1,180	0,983	1,167	0,971	1,147
267	0,918	1,068	0,900	0,913	0,769	0,935	0,816	0,926
271	0,988	1,116	0,986	1,026	0,818	0,974	0,857	0,917
271 (T2)	0,933	1,701	0,879	1,205	0,847	0,928	1,415	1,281
275	0,987	1,076	0,949	0,948	0,806	0,977	0,899	1,004
277	0,978	1,178	0,953	0,926	0,816	0,962	0,885	0,948
291	0,969	1,232	0,930	1,013	0,845	1,007	0,966	0,988
312	0,957	1,186	0,952	1,069	0,888	1,033	0,917	1,010
316	1,028	1,071	0,920	1,074	0,821	1,044	0,878	0,970
316 (T2)	0,997	1,078	0,937	1,041	0,834	1,019	0,869	0,980
326	1,009	1,157	0,963	1,044	0,791	1,034	1,111	1,176
326 (T2)	1,454	1,128	0,954	1,033	0,847	1,487	0,971	1,012
326 (T3)	1,253	1,088	0,945	1,006	0,918	1,322	0,899	1,028
339	0,921	1,058	0,918	0,987	0,892	1,008	0,859	0,993
347	0,944	1,122	0,956	0,920	0,803	0,963	0,912	0,994
347 (T2)	0,952	1,096	0,929	0,945	0,905	1,044	0,881	1,037
373	0,944	1,056	0,916	0,954	0,808	0,969	0,849	0,985
380	0,996	0,938	0,916	0,895	0,823	0,976	0,823	0,966
380 (T2)	1,140	1,004	0,899	0,914	0,830	1,088	0,790	0,984
380 (T3)	0,969	1,021	0,897	0,936	0,840	0,992	0,808	0,970
380 (T4)	0,920	1,018	1,043	1,287	1,025	1,200	1,333	1,156
395	0,919	0,981	1,059	1,307	1,053	1,178	1,360	1,375
396	0,933	1,028	1,105	1,380	1,619	1,855	2,065	1,006
398	0,932	1,173	1,027	1,290	1,017	1,111	1,307	1,375
405	0,973	1,150	1,090	1,271	1,175	1,327	1,973	1,750
408	0,966	1,120	1,037	1,307	1,020	1,040	1,223	0,902
408 (T2)	0,947	1,031	1,036	1,306	1,029	1,040	1,213	0,893
409	0,938	0,971	0,981	1,254	0,959	1,020	1,157	1,576
413	1,130	1,030	1,042	1,315	1,029	1,047	1,206	1,069
413 (T2)	0,960	0,962	0,929	1,011	0,706	0,939	0,966	0,939
418	0,922	1,036	0,948	0,902	0,809	0,960	0,979	0,997
419	0,891	1,057	0,953	0,940	0,758	0,880	1,034	0,853
419 (T2)	0,965	1,026	1,015	0,954	0,896	0,974	1,089	0,895
424	2,018	1,162	1,093	1,317	0,915	1,891	1,311	1,046
430	1,382	1,099	1,031	1,072	0,954	1,313	1,114	1,025
438	1,034	0,953	0,906	0,978	0,837	0,986	1,067	0,962
440	0,981	1,076	0,991	1,036	0,758	0,996	0,966	0,987
443	1,053	1,054	0,981	1,396	0,762	1,054	0,923	0,962
459	1,017	1,407	1,020	1,333	0,871	1,047	0,888	0,962
463	1,002	1,223	1,036	1,079	0,772	1,004	1,822	1,793
520	0,936	0,972	0,935	0,927	0,766	0,912	0,905	0,911
520 (T2)	0,943	1,001	0,949	0,953	0,762	0,913	0,907	0,910

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
40	0,923	1,079	1,059	1,265	1,007	1,389	1,360	1,965
61	0,913	1,012	1,064	1,250	1,027	1,002	1,163	1,102
122	0,956	1,052	1,074	1,072	1,016	1,214	1,170	2,351
122 (T2)	0,931	1,033	1,056	1,261	1,017	1,258	1,318	1,688
141	0,876	0,994	2,939	0,905	1,154	1,380	1,755	1,172
156	0,931	1,033	1,227	1,372	1,379	1,245	1,420	1,586
183	0,962	1,139	1,117	1,039	1,047	1,172	1,629	0,977
183 (T2)	1,110	1,299	1,098	1,217	1,133	1,161	2,333	1,269
187	0,918	1,003	1,063	1,073	1,014	1,076	1,108	0,967
212	0,965	1,009	1,079	1,091	1,004	1,112	1,202	1,270
220	1,279	1,290	1,058	1,265	0,997	0,981	1,213	1,272
248	1,194	1,269	1,060	1,277	1,016	1,206	1,320	2,324
264	1,151	1,210	1,080	1,328	1,025	1,205	1,277	2,013
267	0,897	0,984	1,063	1,305	0,997	1,272	1,400	1,376
271	0,917	0,992	1,102	1,350	1,003	1,166	1,542	1,093
271 (T2)	0,988	1,499	1,077	1,076	1,005	1,114	1,162	1,264
275	1,059	1,092	1,113	1,334	1,105	1,308	1,617	1,477
277	0,907	0,992	1,163	1,368	1,105	1,379	1,403	1,783
291	1,021	1,065	1,490	1,355	1,682	1,933	2,454	1,851
312	0,927	1,012	1,111	1,319	1,075	1,265	1,336	1,837
316	0,983	1,052	1,662	1,209	1,862	2,111	2,560	1,759
316 (T2)	0,968	1,054	1,330	1,231	1,395	1,551	1,891	1,494
326	0,982	1,307	1,096	1,295	1,072	1,337	1,563	1,881
326 (T2)	0,978	1,099	1,519	1,215	1,591	1,844	2,445	1,958
326 (T3)	0,940	1,009	1,338	1,253	1,325	1,613	2,321	1,810
339	0,927	1,008	1,083	1,310	1,051	1,192	1,287	1,556
347	1,043	1,032	1,090	1,099	1,038	1,221	1,168	2,252
347 (T2)	0,953	1,009	1,122	1,318	1,035	1,212	1,273	1,544
373	1,099	0,999	1,031	1,295	1,018	1,161	1,317	1,731
380	0,912	0,987	1,076	1,076	1,024	1,181	1,152	1,466
380 (T2)	0,899	0,976	1,050	1,289	1,034	1,230	1,334	1,357
380 (T3)	0,927	0,992	1,063	1,300	1,048	1,240	1,311	1,386
380 (T4)	0,920	1,018	1,043	1,287	1,025	1,200	1,333	1,156
395	0,919	0,981	1,059	1,307	1,053	1,178	1,360	1,375
396	0,933	1,028	1,105	1,380	1,619	1,855	2,065	1,006
398	0,932	1,173	1,027	1,290	1,017	1,111	1,307	1,375
405	0,973	1,150	1,090	1,271	1,175	1,327	1,973	1,750
408	0,966	1,120	1,037	1,307	1,020	1,040	1,223	0,902
408 (T2)	0,947	1,031	1,036	1,306	1,029	1,040	1,213	0,893
409	0,938	0,971	0,981	1,254	0,959	1,020	1,157	1,576
413	1,130	1,030	1,042	1,315	1,029	1,047	1,206	1,069
413 (T2)	1,373	1,107	1,038	1,312	1,023	1,050	1,220	1,214
418	0,930	1,099	1,634	1,164	1,810	2,004	2,418	1,584
419	0,977	1,025	0,949	1,186	0,928	1,028	1,638	1,700
419 (T2)	0,989	1,019	1,061	0,982	1,004	1,025	1,208	1,100
424	1,087	1,179	1,131	0,988	1,075	1,259	1,373	1,748
430	1,102	1,149	1,016	0,976	0,969	1,027	1,066	1,031
438	0,992	1,041	1,045	0,989	0,972	1,073	1,091	1,328
440	1,011	1,139	1,033	0,956	0,971	1,049	1,049	2,095
443	0,992	1,072	0,992	0,950	0,957	1,031	1,085	1,289
459	0,977	1,030	1,091	1,023	1,067	1,256	1,253	2,130
463	1,088	2,051	1,029	0,986	0,982	1,109	1,158	2,412
520	0,941	0,999	1,040	1,067	1,009	1,199	1,158	2,294
520 (T2)	0,935	0,987	1,052	1,070	1,026	1,191	1,174	2,343

Anexo XIII

Resultados em IR do ELISA para a determinação de anticorpos IgM contra os antígenos recombinantes da PvMSP1 em amostras de soro colhidas de 40 indivíduos durante malária patente. As amostras dos colhidas no 2º, 3º e 4º episódios de malária são identificadas por T2, T3 e T4, respectivamente.

Soro	Belém-2	BR7-2	BP13-2	BP29-2	BP30-2	BP39-2	Belém-6	BR7-6
40	0,645	0,732	0,713	0,916	0,569	0,616	0,828	0,689
61	0,575	0,644	0,649	0,669	0,588	0,660	0,762	0,668
122	0,535	0,873	0,698	0,797	0,627	0,606	0,858	0,713
122 (T2)	0,608	0,747	0,685	0,752	0,560	0,624	0,800	0,669
141	0,629	0,688	0,663	0,729	0,543	0,581	0,766	0,654
156	0,560	0,703	0,615	0,760	0,549	0,590	0,743	0,650
183	0,623	0,700	0,710	0,636	0,680	0,624	0,619	0,853
183 (T2)	0,700	0,827	0,982	0,817	0,837	0,767	0,895	1,031
187	0,720	0,666	0,758	0,572	0,630	0,628	0,611	0,723
212	0,597	0,709	0,698	0,704	0,604	0,622	0,745	0,748
220	0,754	0,915	1,053	0,935	0,769	0,777	1,078	0,893
248	0,709	0,927	0,994	0,935	0,716	0,760	1,070	0,902
264	0,757	0,947	1,147	0,921	0,775	0,776	0,995	0,929
267	0,560	0,712	0,593	0,795	0,575	0,660	0,853	0,709
271	0,608	0,688	0,621	0,805	0,627	0,677	0,747	0,753
271 (T2)	0,647	0,703	0,755	0,656	0,638	0,611	0,671	0,728
275	0,528	0,616	0,529	0,747	0,631	0,636	0,749	0,723
277	0,526	1,088	0,539	0,759	0,645	0,620	0,809	0,721
291	0,833	1,159	0,837	0,924	0,649	0,696	0,907	0,762
312	0,721	0,933	0,745	1,004	0,604	0,630	0,975	0,745
316	0,715	0,848	0,674	0,832	0,581	0,614	0,938	0,719
316 (T2)	0,784	0,904	0,748	0,786	0,658	0,682	0,894	0,774
326	0,701	0,975	0,736	0,933	0,543	0,638	0,991	0,711
326 (T2)	0,585	0,719	0,674	0,799	0,531	0,591	0,828	0,660
326 (T3)	0,580	0,699	0,672	0,733	0,613	0,600	0,772	0,730
339	0,621	0,699	0,655	0,739	0,654	0,639	0,940	0,793
347	0,591	0,673	0,660	0,781	0,575	0,489	0,688	0,591
347 (T2)	0,625	0,660	0,573	0,711	0,656	0,584	0,745	0,695
373	0,641	0,837	0,666	0,758	0,677	0,614	0,713	0,668
380	0,527	0,629	0,612	0,675	0,442	0,465	0,742	0,568
380 (T2)	0,608	0,740	0,698	0,787	0,612	0,622	0,848	0,699
380 (T3)	0,584	0,729	0,684	0,791	0,605	0,618	0,838	0,699
380 (T4)	0,564	0,630	0,654	0,634	0,535	0,584	0,711	0,651
395	0,562	0,661	0,687	0,674	0,468	0,548	0,730	0,623
396	0,568	0,688	0,679	0,674	0,544	0,576	0,714	0,672
398	0,662	0,654	0,704	0,650	0,525	0,630	0,779	0,667
405	0,617	0,664	0,708	0,652	0,602	0,614	0,714	0,759
408	0,651	0,713	0,699	0,703	0,659	0,713	0,655	0,758
408 (T2)	0,647	0,684	0,736	0,683	0,639	0,709	0,617	0,729
409	0,576	0,664	0,648	0,671	0,530	0,582	0,834	0,770
413	0,566	0,670	0,651	0,699	0,537	0,562	0,725	0,681
413 (T2)	0,650	0,692	0,710	0,716	0,565	0,665	0,708	0,669
418	0,608	0,634	0,687	0,611	0,556	0,572	0,661	0,674
419	0,650	0,747	0,853	0,712	0,493	0,505	0,824	0,704
419 (T2)	0,708	0,701	0,853	0,695	0,580	0,654	0,753	0,748
424	0,569	0,653	0,726	0,728	0,583	0,592	0,700	0,663
430	0,539	0,658	0,663	0,671	0,490	0,506	0,740	0,608
438	0,649	0,691	0,746	0,540	0,706	0,735	0,689	0,823
440	0,620	0,759	0,827	0,687	0,635	0,678	0,717	0,827
443	0,542	0,778	0,812	0,794	0,557	0,626	0,873	0,838
459	0,649	0,680	0,823	0,654	0,646	0,685	0,596	0,720
463	0,542	0,707	0,684	0,750	0,461	0,548	0,870	0,766
520	0,592	0,680	0,669	0,674	0,601	0,592	0,799	0,726
520 (T2)	0,634	0,716	0,694	0,657	0,628	0,651	0,759	0,799

Anexo XIII

Soro	BP1-6	BP39-6	BR7-10	BP1-10	BP13-10	BP29-10	BP39-10	MSP-1 ₁₉
40	0,839	0,802	0,940	0,870	0,964	1,014	0,800	1,096
61	0,761	0,735	0,965	0,795	0,903	0,913	0,902	0,849
122	0,850	0,788	0,816	0,652	0,859	0,793	0,737	0,869
122 (T2)	0,822	0,787	0,767	0,900	0,908	0,750	0,835	0,851
141	0,791	0,762	0,853	0,842	0,927	0,972	0,808	0,878
156	0,825	0,762	0,790	1,064	0,856	1,464	0,878	0,871
183	0,681	0,639	0,874	0,750	0,912	0,876	0,869	0,765
183 (T2)	0,874	0,866	0,926	1,054	1,081	0,989	0,838	1,221
187	0,652	0,630	0,758	0,926	0,911	0,933	0,907	0,736
212	0,783	0,669	0,956	0,662	0,834	0,808	0,827	0,861
220	0,996	0,969	1,299	0,766	0,903	0,938	0,744	0,838
248	1,016	0,975	1,750	0,683	0,825	0,860	0,692	0,851
264	0,940	0,929	1,644	0,836	0,931	0,995	0,794	0,861
267	0,815	0,804	1,016	0,702	0,807	0,834	0,644	0,826
271	0,789	0,764	0,936	1,074	1,062	1,122	0,979	0,898
271 (T2)	0,704	0,710	0,794	0,901	0,930	0,908	0,785	0,850
275	0,801	0,744	0,899	0,901	0,956	0,983	0,874	0,889
277	0,821	0,791	1,102	0,741	0,874	0,886	0,716	0,864
291	0,849	0,827	0,998	0,818	0,927	0,988	0,782	0,895
312	0,893	0,859	1,778	0,961	0,987	1,143	0,881	1,093
316	0,846	0,847	1,831	0,692	0,820	0,771	0,584	0,908
316 (T2)	0,857	0,854	0,815	0,910	0,811	0,704	0,849	1,165
326	0,881	0,894	1,705	0,565	0,724	0,706	0,504	0,858
326 (T2)	0,840	0,788	0,581	0,712	0,730	0,506	1,113	2,117
326 (T3)	0,806	0,769	0,744	0,866	0,857	0,672	0,867	0,945
339	0,809	0,880	0,901	0,788	0,880	0,879	0,670	0,805
347	0,754	0,677	1,136	0,754	0,821	0,814	0,772	0,809
347 (T2)	0,785	0,740	0,822	0,909	0,906	0,746	0,848	0,861
373	0,797	0,711	0,858	0,683	0,750	0,762	0,681	0,774
380	0,715	0,724	0,861	0,691	0,784	0,767	0,668	0,872
380 (T2)	0,820	0,785	0,650	0,790	0,805	0,549	0,832	0,915
380 (T3)	0,824	0,754	0,659	0,785	0,796	0,560	0,816	0,966
380 (T4)	0,682	0,714	0,580	0,707	0,674	0,520	0,800	0,848
395	0,715	0,718	0,822	0,667	0,760	0,786	0,593	0,809
396	0,725	0,720	0,873	0,716	0,842	0,856	0,651	0,826
398	0,719	0,748	0,800	0,835	0,871	0,879	0,745	0,815
405	0,703	0,730	1,020	0,917	0,960	1,014	0,839	0,921
408	0,727	0,705	0,920	0,786	0,839	0,875	0,680	0,848
408 (T2)	0,698	0,612	0,825	0,881	0,897	0,691	0,856	0,888
409	0,754	0,799	1,028	0,722	0,776	0,837	0,645	0,857
413	0,790	0,740	1,038	0,639	0,751	0,777	0,553	0,845
413 (T2)	0,765	0,695	0,690	0,785	0,787	0,596	0,859	1,039
418	0,695	0,679	0,826	0,762	0,808	0,827	0,677	0,818
419	0,790	0,774	0,960	0,834	0,970	0,940	0,706	0,955
419 (T2)	0,751	0,735	0,936	1,042	0,939	0,900	0,844	1,127
424	0,745	0,689	0,982	0,782	0,895	0,815	0,746	0,791
430	0,773	0,691	0,871	0,703	0,804	0,741	0,668	0,770
438	0,733	0,611	1,109	0,843	0,925	0,752	0,814	0,782
440	0,738	0,730	0,867	0,900	1,040	0,918	0,888	0,809
443	0,741	0,853	1,027	0,771	0,857	0,883	0,878	0,815
459	0,699	0,693	1,256	0,870	0,940	0,892	0,828	0,780
463	0,739	0,824	0,727	0,695	0,791	0,753	0,688	0,743
520	0,764	0,741	2,181	0,737	0,805	0,798	0,741	0,807
520 (T2)	0,758	0,755	0,766	0,828	0,775	0,792	0,821	1,745

VIII- REFERÊNCIAS

Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopatology. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 133:145-52.

Baird JK, Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48:4075-83.

Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J. Exp. Med.* 1990; 172:379-82.

Blackman MJ, Ling IT, Nicholls SC, Holder AA. Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991. 49:29-33.

Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J. Exp. Med.* 1994. 180:389-93.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-54.

Carter R, Mendis K. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical Microbiology Reviews.* 2002; 15:564-94.

Cimerman B, Cimerman S. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. 2ª ed. São Paulo, editora Atheneu, 1999.

Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, Bojang KA, Oduola MJ, Kremsner PG, Arnot DE, Greenwood BM, McBride JS. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nature. Medicine*. 2000. 6:689-92.

Cooper JA. Merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium*. *Parasitology Today*. 1993; 9:50-4.

Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* population. *Trends in Parasitology*. 2003 19:220-6.

da Silveira LA, Dorta ML, Kimura EAS, Katzin AM, Kawamoto F, Tanabe K, Ferreira MU. Allelic diversity and antibody recognition of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 during hypoendemic malaria transmission in the Brazilian Amazon Region. *Infect. Immun*. 1999. 67:5906-16.

del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1991; 88:4030-4.

Fell AH, SMITH, N.C. Immunity to asexual blood stages of *Plasmodium*: In resistance to acute malaria adaptive or innate? *Parasitology Today*. 1998; 14:364-9.

Ferreira MU, Liu Q, Zhou M, Kimura M, Kaneko O, Thien HV, Isomura S, Tanabe K, Kawamoto F. Stable patterns of allelic diversity at the merozoite

surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from southern Vietnam. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1998; 45:131-6.

Ferreira MU, Ribeiro WL, Tonon AP, Kawamoto F, Rich SM. Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*. *Gene*. 2003; 304:65-75.

Ferreira MU, da Silva-Nunes M, Wunderlich G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clin Diagn. Lab. Immunol*. 2004. 11:987-95.

Fundação Nacional da Saúde - FUNASA. www.funasa.gov.br. 2006.

Gibson HL, Tucker JE, Kaslow DC, Krettli AU, Collins WE, Kiefer MC, Bathurst IC, Barr PJ. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1992. 50:325-34.

Guerra CA, Snow RW, Ray SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends in Parasitology*. 2006; 22:353-8.

Han HJ, Park SG, Kim SH, Hwang SY, Han J, Traicoff J, Kho WG, Chung JY. Epidermal growth factor-like motifs 1 and 2 of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 are critical domains in erythrocyte invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 320:563-70.

Herrera S, Corradin G, Arévalo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends in Parasitology*. 2007. 23:122-8.

Holder AA, Freeman RR. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 1982; 156:1528-38.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. www.ibge.gov.br. 1998.

Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira – INEP. www.inep.gov.br. 2004.

John CC, O'Donnell RA, Sumba PO, Moormann AM, de Koning-Ward TF, King CL, Kazura JW, Crabb BS. Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP-1 19) can play a protective role against blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in individuals living in a malaria endemic area. *J. Immunol.* 2004. 173:666-72.

Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, Yamaguchi Y, Tanabe K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitology International.* 1997; 46:91-5.

Kirchgatter K, Portillo HA. Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker. *The Journal of Infectious Diseases.* 1998; 177:511-5.

Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-5.

Leclerc MA, Gauthier C, Villegas L, Urdaneta L. Genetic diversity of merozoite surface protein-1 gene of *Plasmodium vivax* isolates in mining villages of Venezuela (Bolívar State). *Acta Tropica*. 2005; 95:26-32.

Levitus G, Mertens F, Sperança MA, Camargo LMA; Ferreira MU, del Portillo HA. Characterization of naturally acquired human IgG responses against the N-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 51:68-76.

Mancilla LI, Levitus G, Kirchgatter K, Mertens F, Herrera S, del Portillo HA. *Plasmodium vivax*: Dimorphic DNA sequences from the MSP-1 gene code for regions that are immunogenic in natural infections. *Exp. Parasitol.* 1994. 79:148-58.

Martinelli A, Cheesman S, Hunt P, Culleton R, Raza A, Mackinnon M, Carter R. Genetic approach to the *de novo* identification of targets of strain-specific immunity in malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. 102:814-9.

Mendis KN, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 64:97-106.

Mercereau-Puijalon O, Fandeur T, Guillotte M, Bonnefoy S. Parasite features impeding malaria immunity: antigenic diversity, antigenic variation and poor immunogenicity. *Res. Immunol.* 1991. 142:690-7.

Mertens F, Levitus G, Camargo LMA, Ferreira MU, Dutra AP, del Portillo HA. Longitudinal study of naturally acquired humoral immune responses against the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in patients from Rondonia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; 49:383-92.

Ministério da Saúde. www.saude.gov.br. 2006.

Nogueira PA, Alves FP, Fernandez-Becerra C, Pein O, Santos NR, Silva LHP, Camargo EP, del Portillo HA. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infection and Immunity*. 2006; 74:2726-33.

O'Donnell RA, Koning-Ward TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF, Crabb BS. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1₁₉ are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J. Exp. Med.* 2001; 193:1403-12.

Perlmann P, Troye-Blomberg M. *Malaria Immunology*. 2^a ed. Stockholm, Karger, 2002.

Plebanski M, Hill AVS. The immunology of malaria infection. *Current Opinion in Immunology*. 2000; 12:437-41.

Premawansa S, Snewin VA, Khouri E, Mendis KN, David PH. *Plasmodium vivax*: recombination between potential allelic types of the merozoite surface protein MSP1 in parasites isolated from patients. *Exp. Parasitol.* 1993; 76:192-9.

Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tanabe K, Thaithong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1997; 84:49-56.

Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *PNAS*. 2002; 99:16348-53.

Putaporntip C, Jongwutiwes S, Iwasaki Takuya, Kanbara H, Hughes AL. Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006. 146:105-8.

Rey L. *Bases da Parasitologia Médica*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.

Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunology*. 2006; 28:35-49.

Sachdeva S, Ahmad G, Malhotra P, Mukherjee P, Chauhan VS. Comparison of immunogenicities of recombinant *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 19- and 42-kilodalton fragments expressed in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 2004; 72:5775-82.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Scopel KKG, Fontes CJF, Ferreira MU, Braga EM. *Plasmodium falciparum*: IgG subclasses antibody response to merozoite surface protein-1 among Amazonian gold miners, in relation to infection status and disease expression. *Exp. Parasitol.* 2005. 109:124-34.

Secretaria Estadual de Saúde do Acre - SESACRE. www.saude.ac.gov.br. 2006.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993; 58:283-92.

Soares IS, Levitus G, Souza JM, del Portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infection and Immunity.* 1997; 65:1606-14.

Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Tropica.* 1999a; 72:13-24.

Soares IS, Barnwell JW, Ferreira UM, Cunha MG, Laurino JP, Castilho BA, Rodrigues, MM. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. *Molecular Medicine.* 1999b; 5:459-70.

Soares IS, Cunha MG, Silva MN, Souza JM, del Portillo HÁ, Rodrigues MM. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999c; 60:357-63.

Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. Allelic dimorphism in a surface gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Molecular Biology*. 1987; 195:273-87.

Taylor RR, Egan A, McGuinness D, Jepson A, Adair R, Drakely C, Riley E. Selective recognition of malaria antigens by human serum antibodies is not genetically determined but demonstrates some features of clonal imprinting. *International Immunology*. 1996. 8:905-15.

Towbin N, Satehelin T, Bordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979; 76: 43650-4.

Trape, JF. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985; 79:181-4.

Valero LMS, Ogun SA, Fleck SL, Ling IT, Scott-Finnigan TJ, Blackman MJ, Holder AA. Passive immunization with antibodies against three distinct epitopes on *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1 suppresses parasitemia. *Infection and Immunity*. 1998; 66:3925-30.

World Health Organization - WHO. www.who.int. 2006.

Win TT, Lim K, Mizuno S, Zhou M, Liu Q, Ferreira MU, Tantular I S, Kojima S, Ishii A, Kawamoto F. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. *Tropical Medicine and International Health*. 2002; 7:231-9.

Wipasa J, Elliott S, Xu H, Good MF. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunology and cell biology*. 2002; 80:401-14.

Yang C, Collins WE, Sullivan JS, Kaslow DC, Xiao L, Lal AA. Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *Saimiri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. *Infection and Immunity*. 1999; 67:342-9.