Mônica Eriko Kudó

Níveis e avidéz de anticorpos IgG
específicos para a porção de 19kDa da
região C-terminal da proteína-1 de superfície
de merozoítos de *P. vivax* (MSP1₁₉) em
grupos populacionais expostos à malária

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira

São Paulo

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Kudó, Mônica Eriko

Níveis e avidéz de anticorpos IgG específicos para a porção de 19kDa da região C-terminal da proteína-1 de superfície de merozoítos de *P. vivax* (MSP1₁₉) em grupos populacionais expostos à malária / Mônica Eriko Kudó. -- São Paulo, 2006.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Antônio Walter Ferreira.

Descritores: 1.Proteína 1 de superfície de merozoíto 2.*Plasmodium vivax*
3.Imunoglobulina G 4.Elisa 5.Afinidade de anticorpos 6.Malária 7.Anticorpos
8.Grupos populacionais

USP/FM/SBD-346/06

Os cientistas tentaram entender a felicidade. Pesquisaram-na, fizeram estatísticas, mas ela os confundiu, falando-lhes:

“A lógica numérica jamais compreenderá a lógica da emoção!” Perturbados, descobriram que o mundo da emoção é indecifrável pelo mundo das idéias. Por isso, os cientistas que viveram uma vida exclusivamente lógica e rígida foram infelizes.

Augusto Cury

À DEUS,

”Siga em frente. Não olhe para traz, senão para recolher as lições que o passado tem para lhe dar, como estímulos para o seu futuro.”

“Vá com as forças que Deus lhe deu, mais depressa ou mais vagarosamente, porém, vá sempre em frente, certo de que o seu destino não é chegar já, mas é chegar bem ao endereço da sua felicidade.”

Pe. Nobre

AOS MEUS PAIS,

Por fazer do meu sonho o deles, pelas palavras de carinho, apoio e incentivo, pelo amor incondicional. Por fazer da distância que nos separa um breve esperar para um novo reencontro...minha eterna gratidão!

À MINHA IRMÃ,

Pelos momentos que passamos juntas, por me ensinar que podemos mudar, podemos vencer qualquer obstáculo, que para crescer precisamos de tempo...e o tempo deve ser nosso aliado. Por estar presente em pensamento, por ser iluminada e única...irmã.

À TODA MINHA FAMÍLIA,

Por todo apoio e incentivo... em especial aos meus tios Heluiza e Makoto Yamada, por me acolherem como filha, por todo carinho e atenção.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Antônio Walter Ferreira pela oportunidade de realizar este trabalho, pelos ensinamentos, confiança e por me ajudar a ultrapassar os obstáculos enfrentados durante essa jornada.

À Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez, por todo o apoio desde a elaboração até a conclusão deste trabalho, pelo carinho, pela amizade, paciência e compreensão, durante todos esses anos.

À Dra. Sandra do Lago Moraes, pelo carinho e incentivo, por ser um exemplo a seguir...

À Dra. Guita R. Elefant, pelos conselhos, pela amizade e apoio.

Aos membros da Banca de Qualificação Dra. Hiro Goto, Dra. Sílvia di Santi e Dra. Adeláide José Vaz pelas sugestões dadas durante o exame de qualificação.

À Juliana Santos Coelho pela amizade de longa data, pelo companheirismo e solidariedade nas horas difíceis e pelas comemorações nos momentos de glória.

Às amigas do laboratório, Fabiana Leoratti, Kelly Kanunfre, Sarita Gobbo, Renata Tunis, Tatiane Salvador, Larissa Costa, Elaine Lemos, Sandra Beck, Janaína Bezerra, Érika Hoffmann, Patrícia Araújo, Melissa Bastos, pelos momentos de alegria, aprendizado e amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Cotrim, pelos conselhos e ajuda em um dos momentos mais difíceis desse trabalho.

À Tânia e a Sônia da Fisiopatologia Experimental, por me atenderem sempre que necessário.

À Dra. Silvia di Santi e funcionários da SUCEN que ajudaram na coleta do material dos pacientes em acompanhamento.

Aos meus amigos, ou melhor, minha “família de São Paulo”, Amanda Friend, Carol, Amanda Frade, Amarah, Cristiano, Ivo, Isolda, Vanessa, Bosco, Wilson e Márcia, por estarem sempre presentes, tantos nos momentos de alegria ou tristeza, de conquista ou derrota, desde que chegamos a essa cidade, sempre comemorando, não importa o motivo... o final é sempre feliz. Minha eterna gratidão, amo vocês!!

A todo pessoal do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do IMTSP, Eunice, Paulo Oliveira, Renato, Artur, Ione, Edna, Priante, Fabrício, Beatriz, Ângelo, Érika, Mussya, Sandra, Edite, Sueli, Juliana, Adriano.

A todos que me ensinaram a transformar perdas em crescimento pessoal e profissional...

Muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, sob apoio do LIM/HCFMUSP - 48

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Summary	
INTRODUÇÃO.....	1
1. Ciclo biológico e patogenia.....	2
2. Epidemiologia.....	8
3. Imunidade.....	12
4. Proteína 1 de superfície de merozoíto – MSP1.....	17
5. Avidéz e afinidade.....	22
6. Racional do estudo.....	26
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
1. Casuística.....	30
1.1. Soros de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> procedentes da região Amazônica.....	30
1.1.1. Belém – PA.....	30
1.1.2. Igarapé-Açu.....	31
1.2. Soros de moradores de Alta Floresta.....	31
1.2.1. Características do município à época das coletas.....	31
1.2.2. Amostras coletadas.....	32
1.3. Soros de pacientes atendidos na SUCEN.....	34
1.3.1. Com primo infecção.....	35
1.3.2. Acompanhamento pré e pós-terapêutico.....	35
1.4. Soros de indivíduos com outras patologias não relacionadas à malária.....	35
1.5. Soros de indivíduos doadores de banco de sangue.....	36
1.6. Soros de funcionários do laboratório.....	36

1.7. Soros-padrão.....	36
2. Aspectos éticos da pesquisa.....	37
3. Obtenção do antígeno <i>PvMSP1₁₉</i>	38
4. Pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i>	39
4.1. Padronização das condições do teste ELISA.....	39
4.2. Determinação do Limiar de Reatividade (LR).....	39
4.3. Curva ROC.....	40
4.4. Cálculo do Índice de Reatividade (IR).....	41
5. Estudo da avidéz dos anticorpos IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i>	41
5.1. Cálculo do Índice de Avidéz (IA).....	42
5.1.1. Cálculo do IA à Primeira Diluição.....	42
5.1.2. Cálculo do IA ao ponto do Limiar de Reatividade.....	42
5.1.3. Cálculo do IA ao ponto de 50% da absorbância máxima com uréia.....	44
6. Análise Estatística dos Resultados.....	45
RESULTADOS.....	47
1. Padronização das condições do teste ELISA.....	48
2. ELISA IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i>	49
3. Determinação do Limiar de Reatividade utilizando a Curva ROC.....	50
4. Avaliação dos grupos estudados – Índice de Reatividade.....	54
4.1. Pacientes com malária por <i>P. vivax</i>	54
4.2. Acompanhamento pré e pós-terapêutico de pacientes com malária.....	59
4.3. Moradores de Alta Floresta, MT.....	60
5. Estudo do comportamento do Índice de Avidéz (IA).....	67
5.1. Comparação entre os métodos de cálculo do Índice de Avidéz (IA).....	67
5.2. Grupos de pacientes com malária por <i>P. vivax</i>	71
5.3. Acompanhamento pré e pós-terapêutico de pacientes com malária.....	72
5.4. Moradores de Alta Floresta, MT.....	73
DISCUSSÃO.....	76
CONCLUSÕES.....	89
ANEXOS.....	93
REFERÊNCIAS.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS

DBP	“Duffy binding protein”
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” – ensaio imunoenzimático
FAN	Fator anti-núcleo
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IFN-γ	Interferon-gama
IA	Índice de Aidez
IPA	Índice de parasitemia anual por mil habitantes
IR	Índice de Reatividade
kDa	kilodalton
LR	Limiar de Reatividade
M	Molar
Med	Mediana
mg	miligrama
mL	mililitro
MSP1	Proteína 1 de superfície de merozoíto
N	Normal
nm	nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Ortofenilenodiamina
<i>P. f</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. v</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PBS	“Phosphate Buffer Saline” – Solução salina tamponada com fosfato
PvRBP-1	“ <i>Plasmodium vivax</i> reticulocyte biding protein-1”
PvRBP-2	“ <i>Plasmodium vivax</i> reticulocyte biding protein-2”
qsp	quantidade suficiente para
ROC	“Receiver Operating Characteristic”
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
TA	Temperatura ambiente
μL	microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Mecanismos efetores da imunidade à malária em indivíduos residentes em áreas endêmicas.	15
Tabela 2	Absorbância média dos soros padrão positivo e negativo, obtidas no teste ELISA para a pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>PvMSP1</i> ₁₉ , empregando os protocolos A e B.	48
Tabela 3	Variações de sensibilidade, especificidade e índice de Youden, do teste ELISA IgG anti- <i>PvMSP1</i> ₁₉ , definidos pelos pontos de corte (limiar de reatividade) da curva <i>ROC</i> .	53
Tabela 4	Variações de sensibilidade, especificidade e índice de Youden, do teste ELISA IgG anti- <i>PvMSP1</i> ₁₉ , definidos pelos pontos de corte (limiar de reatividade) da curva <i>ROC</i> .	53
Tabela 5	Porcentagens de positividade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) e medianas dos índices de reatividade (IR) de IgG anti- <i>PvMSP1</i> ₁₉ , nos grupos de pacientes com malária.	58
Tabela 6	Porcentagens de positividade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) e medianas dos índices de reatividade (IR) de IgG anti- <i>PvMSP1</i> ₁₉ , das amostras dos moradores de Alta Floresta, conforme a região da residência.	61
Tabela 7	Porcentagens de positividade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) e medianas dos índices de reatividade (IR) de IgG anti- <i>PvMSP1</i> ₁₉ , das amostras dos moradores de Alta Floresta, conforme a região da residência, nas três coletas.	63
Tabela 8	Porcentagens de positividade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) e medianas dos índices de reatividade (IR) de IgG anti- <i>PvMSP1</i> ₁₉ , das amostras dos moradores de Alta Floresta, conforme o tempo decorrido desde o último episódio de malária (TUM).	65

Tabela 9	Associação entre o resultado do ELISA <i>PvMSP1</i> ₁₉ e os dados epidemiológicos (tempo decorrido após o último episódio de malária e número de episódios de malária anteriores) em moradores de Alta Floresta com gota espessa negativa.	66
Tabela 10	Análise comparativa das medianas dos índices de avidéz (IA) de IgG anti- <i>PvMSP1</i> ₁₉ , obtidos pelos três métodos de cálculo, nos grupos de pacientes estudados.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> no hospedeiro humano e no vetor, fêmea do mosquito <i>Anopheles</i> .	4
Figura 2	Distribuição mundial de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> em 2005.	9
Figura 3	Esquema do processamento secundário da MSP1 de <i>P. falciparum</i> .	18
Figura 4	Representação esquemática do gene MSP-1 de <i>P. vivax</i> .	21
Figura 5	Mapa do município de Alta Floresta, MT com a indicação das 5 regiões estudadas.	33
Figura 6	Exemplo de gráfico para cálculo do índice de avides, no ponto do Limiar de Reatividade (LR).	43
Figura 7	Exemplo de gráfico para cálculo do índice de avides, no ponto de 50% da absorbância máxima com uréia.	45
Figura 8	(a) Curva ROC das absorbâncias de IgG anti-PvMSP1 ₁₉ de 160 amostras de soro de pacientes com gota espessa positiva para <i>P. vivax</i> , 125 indivíduos “saudáveis” e 77 de outras patologias. (b) Distribuição das freqüências das absorbâncias de infectados e não infectados.	51
Figura 9	(a) Curva ROC das absorbâncias de IgG anti-PvMSP1 ₁₉ de 160 amostras de soro de pacientes com gota espessa positiva para <i>P. vivax</i> e 125 indivíduos saudáveis. (b) Distribuição das freqüências das absorbâncias de infectados e não infectados.	52
Figura 10	Distribuição dos índices de reatividade de IgG anti-PvMSP1 ₁₉ em: (a) 125 amostras controle negativo, 77 de outras doenças, 38 gota espessa positiva para <i>P. vivax</i> , 122 primo infectados por <i>P. vivax</i> e 24 primo infectados por <i>P. falciparum</i> . (b) 100 amostras de doadores de banco de sangue (BS), 25 de funcionários do laboratório (LAB), 10 reativas para fator antinúcleo (FAN), 7 para sífilis (SÍF), 6 para toxoplasmose (TOXO), 12 para mononucleose (MONO), 6 para Doença de Chagas (CHAG), 5 para Leishmaniose Mucocutânea (LMC), 5 para Leishmaniose Cutânea (LC) e 26 para Fator Reumatóide.	55

Figura 11	Distribuição dos índices de reatividade de IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i> em 17 amostras com gota espessa positiva para <i>P. vivax</i> de Belém, 4 de Igarapé-Açu, 13 de Alta Floresta, 4 da SUCEN, 4 com gota espessa positiva para <i>P. falciparum</i> , 33 com primo infecção por <i>P. vivax</i> de Belém, 21 da SUCEN, 67 de Igarapé-Açu, 1 de Alta Floresta e 24 com primo infecção por <i>P. falciparum</i> .	57
Figura 12	Evolução dos níveis de anticorpos IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i> nos 13 pacientes com malária <i>vivax</i> , acompanhados na SUCEN, nos períodos pré (T0) e pós-tratamento (T1 = 15 dias, T2 = 1 mês, T3 = 6 meses).	59
Figura 13	Distribuição dos índices de reatividade de IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i> nas diferentes regiões de Alta Floresta, divididas pelo número da coleta (C).	62
Figura 14	Distribuição dos índices de reatividade de IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i> em 14 pacientes com malária atual por <i>P. vivax</i> , 62 pacientes que tiveram malária até 1 mês antes da coleta, 85 coletadas depois de 1 mês e antes de 6 meses da última malária, 193 coletadas depois de 6 meses e antes de 2 anos, 199 coletadas depois de 2 anos e 501 amostras de pacientes que nunca tiveram malária.	64
Figura 15	Gráficos de regressão linear dos índices de avides (IA) de IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i> , calculados pelos métodos estudados, relacionados dois a dois, em amostras de moradores de Alta Floresta, que haviam apresentado o último episódio de malária há, no máximo 6 meses da coleta (a) , (b) , (c) e em pacientes com gota espessa positiva para <i>P. vivax</i> no momento da coleta (d) , (e) , (f) .	69
Figura 16	Gráficos de regressão linear entre os índices de avides (IA) de IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i> , e dados epidemiológicos: TUM – tempo decorrido desde o último episódio de malária (a) , (b) , (c) . NM – número de episódios de malárias anteriores (d) , (e) , (f) .	70
Figura 17	Distribuição dos índices de avides de IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i> em 16 amostras gota espessa positiva para <i>P. vivax</i> de Belém, 4 de Igarapé-Açu, 12 de Alta Floresta, 3 da SUCEN, 32 com primo infecção por <i>P. vivax</i> de Belém, 66 de Igarapé-Açu, 18 da SUCEN e 1 de Alta Floresta.	72

Figura 18	Evolução dos índices de avidéz de IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i> em 11 pacientes, com malária <i>vivax</i> , acompanhados na SUCEN, nos períodos pré (T0) e pós-tratamento (T1 = 15 dias, T2 = 1 mês, T3 = 6 meses).	73
Figura 19	Distribuição dos índices de avidéz de IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i> nas diferentes amostras de Alta Floresta. (a) regiões de Alta Floresta e (b) nas coletas.	74
Figura 20	Distribuição dos índices de avidéz de IgG anti- <i>PvMSP1₁₉</i> em 13 pacientes com malária atual, 35 pacientes que tiveram malária até 1 mês antes da coleta e 41 coletados depois de 1 mês e antes de 6 meses da última malária.	75

RESUMO

Kudó ME. *Níveis e avides de anticorpos IgG específicos para a porção de 19kDa da região C-terminal da proteína-1 de superfície de merozoítos de P. vivax (MSP1₁₉) em grupos populacionais expostos à malária* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

O objetivo deste trabalho foi estudar a resposta imune, quanto ao nível e à avides dos anticorpos IgG, dirigidos contra o antígeno recombinante derivada da Proteína 1 de Superfície de Merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP1₁₉) em indivíduos residentes em diferentes áreas endêmicas do Brasil, empregando o teste ELISA. Para tanto, foram estudadas amostras de indivíduos expostos à malária, infectados ou não e em acompanhamento terapêutico. Na padronização das condições de reação, obteve-se uma sensibilidade de 95,00% em amostras de pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax* e uma especificidade de 99,50% em amostras de indivíduos saudáveis e com outras patologias. Entre as amostras de pacientes com *P. falciparum*, 7,14% foram reagentes. O estudo dos diferentes grupos de pacientes com malária *vivax* mostrou haver diferença significativa entre os primo infectados e aqueles com episódios anteriores de malária, sendo os níveis (IR) e avides (IA) de IgG mais baixos nos primo infectados, embora os níveis de anticorpos já estivessem elevados nesses pacientes. A predominância de IgG anti-PvMSP1₁₉ de baixa avides nos pacientes primo infectados por *P. vivax*, sugere um baixo grau de proteção, mesmo na presença de elevados níveis de anticorpos observados já no início da infecção. A análise dos indivíduos não infectados mostrou haver uma associação negativa dos resultados de IR com o tempo decorrido desde o último episódio de malária e associação positiva com o número de malárias anteriores. Em relação aos IA houve associação positiva com ambos os parâmetros, nos pacientes que haviam tido malária até, no máximo, seis meses antes da coleta. Entre os pacientes que haviam apresentado episódios de malária anteriores, observaram-se níveis mais baixos de anticorpos IgG anti-PvMSP1₁₉ em indivíduos com alta exposição à malária, quando comparados a moradores de áreas com baixa transmissão. Em relação à avides, foram encontrados índices mais elevados nas áreas de maior transmissão. Considerando-se o município de Alta Floresta, nas regiões de garimpo e próximas à mata, obtiveram-se altos índices de positividade com níveis e avides dos anticorpos mais elevados que nas demais regiões. Não foi observada correlação entre níveis e avides dos anticorpos IgG anti-PvMSP1₁₉.

Descritores: 1. Proteína 1 de superfície de merozoíto 2. *Plasmodium vivax* 3. Imunoglobulina G 4. ELISA 5. Afinidade de anticorpos 6. Malária 7. Anticorpos 8. Grupos populacionais

SUMMARY

Kudó ME. *Level and avidity of specific IgG antibodies to C-terminal 19kDa of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 (MSP1₁₉) in population groups exposed to malaria* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo: 2006.

The aim of this work was to study the level and avidity of IgG antibodies specific to *Plasmodium vivax* using the recombinant protein corresponding to 19kDa C-terminal of the merozoite surface protein 1 region (PvMSP1₁₉) in individuals living in distinct malaria endemic areas, using ELISA test. Thus, samples from individuals exposed to malaria, with patent infection or not were evaluated. The reaction conditions were standardized, yielding 95.00% sensitivity with sera from *P. vivax* infected patients and 99.50% specificity with sera from individuals non-exposed to *P. vivax* malaria. Just 7.14% of patient samples with *P. falciparum* malaria reacted to PvMSP1₁₉. The investigation of different groups of *vivax* malaria patients showed significant differences between patients with primo infection and those with past malaria episodes. The levels and avidity of IgG were lower in primo infected ones. The predominance of low avidity IgG in *P. vivax* primo infected patients may suggest low grade of protection even in high level antibody sera. The analysis of non-infected subjects showed a negative association of IgG levels and time elapsed since last malaria episode, and a positive association to the number of malaria episodes. For individuals who had had last malaria episode till maximum six months before the collecting of blood samples, avidity indexes showed positive association for both parameters described before. Individuals sporadically exposed to malaria transmission (Belém group) and who experienced their last episode by *P. vivax* had significant high levels and proportions of specific antibodies when compared to subjects continuously exposed (Alta Floresta group). Otherwise, higher avidity levels were detected in high transmission areas. In god mines and forest areas of Alta Floresta, higher IgG and avidity levels were obtained, as compared to the other regions of the municipality. No correlation was observed between anti-PvMSP1₁₉ IgG levels and avidity levels.

Descriptors: 1. Merozoite surface protein 1 2. *Plasmodium vivax* 3. Immunoglobulin G 4. ELISA 5. Antibodies avidity 6. Malaria 7. Antibodies 8. Population groups

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. CICLO BIOLÓGICO E PATOGENIA

A malária é causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, da família *Plasmodiidae*, filo *Apicomplexa*. Existem aproximadamente 156 espécies de *Plasmodium* que infectam vários vertebrados, dessas, quatro infectam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. No Brasil, encontramos três espécies de plasmódios infectando o homem, *P. falciparum*, *P. vivax* e, eventualmente, *P. malariae*.

Em relação ao vetor, *Anopheles darlingi* é a espécie de maior importância epidemiológica pela sua abundância, ampla distribuição no território nacional, atingindo todo o interior do País, alto grau de antropofilia e endofagia e capacidade de transmitir diferentes espécies de *Plasmodium*. Tem como criadouros preferenciais: água limpa, de baixo fluxo, quente e sombreada, situação muito freqüente na Região Amazônica (Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2005).

O ciclo de vida do parasito inicia-se quando, ao picar um indivíduo para se alimentar, com cerca de 5 picolitros de sangue, a fêmea dos mosquitos do gênero *Anopheles* injeta através da saliva alguns esporozoítos que, uma vez lançados na corrente sanguínea, irão se alojar nos hepatócitos, iniciando um ciclo de reprodução assexuada, conhecido como

ciclo pré-eritrocítico. Nesse período, que dura cerca de 10 dias, são produzidos e lançados de volta, na corrente sangüínea, milhares de merozoítos que irão invadir os eritrócitos e/ou reticulócitos, dando origem ao ciclo eritrocítico, que é responsável pela patogenia e manifestações clínicas da malária. Em *P. vivax* e *P. ovale* existe um estágio dormente, os hipnozoítos, que podem persistir no fígado e causar recaídas quando invadem as hemácias.

Na fase sangüínea, o parasito passa por três estágios: anel, trofozoíto e esquizonte, que após a maturação libera os merozoítos na corrente sangüínea para invasão de novos eritrócitos e início de um novo ciclo. Após um período de reprodução assexuada, alguns trofozoítos se diferenciam em gametócitos, que amadurecem sem divisão celular e são as formas infectantes para o mosquito vetor, onde ocorre o ciclo sexuado.

No intestino do mosquito ocorre a maturação dos gametócitos, processo denominado gametogênese, que é seguida pela fertilização, com a união de gametas masculino e feminino gerando um zigoto. Este migra e adere ao epitélio do intestino, onde se desenvolve num oocisto, dando início à esporogonia. Quando o oocisto se rompe, há liberação de esporozoítos que vão até a glândula salivar e são liberados durante a alimentação da fêmea. A **figura 1** ilustra o ciclo de vida de *Plasmodium*.

Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* no hospedeiro humano e no vetor, fêmea do mosquito *Anopheles* (modificado de Struik e Riley, 2004).

O ciclo eritrocítico é responsável pela patogenia e manifestações clínicas da malária. Em indivíduos não-imunes, o paroxismo malárico é a principal característica clínica da malária, constituindo-se por febre, calafrios e cefaléia, como consequência da ruptura das hemácias infectadas com esquizontes, pois ocorre a exposição do material do parasito ao sistema imune e outros sistemas fisiológicos do hospedeiro.

Em infecções naturais, os primeiros dois ou três ciclos de ruptura dos esquizontes no sangue podem ser assintomáticos (Karunaweera et al., 2003). Os sintomas associados com o paroxismo são específicos para cada espécie de plasmódio. Nas infecções produzidas por *P. falciparum*, as formas graves, como o comprometimento do cérebro, rins, pulmões, fígado e sangue, apresentam-se nos indivíduos não-imunes, gestantes e crianças. Em contraste, infecções por *P. vivax* não apresentam, na maioria dos casos, sérios riscos ou complicações, e o paroxismo ocorre em intervalos de 48 horas (Karunaweera et al., 2003).

Embora a malária *vivax* não apresente a mesma gravidade e taxa de mortalidade que a causada por *P. falciparum*, possui uma alta morbidade e conseqüentemente um impacto econômico nas comunidades em que é endêmica (Arévalo-Herrera e Herrera, 2001). De um modo geral, cada indivíduo residente em uma área de endemicidade moderada para *P. vivax* pode ter de 10 a 30 episódios de malária, durante a infância e vida adulta produtiva (Mendis et al, 2001).

A ocorrência de recaídas e a resistência aos antimaláricos contribuem para dificultar o seu controle (Whitby, 1997). O sucesso do tratamento da malária *vivax* depende da eliminação dos estágios eritrocitários e hepáticos. O primeiro relato de *P. vivax* resistente à cloroquina, que é a droga de escolha para a eliminação dos estágios eritrocitários, foi em 1989 (Rieckmann et al., 1989) e, a partir daí, vários trabalhos foram feitos sobre o encontro de cepas resistentes, principalmente

no Sudeste da Ásia (Whitby, 1997; Fryauff et al., 1998). Porém, alguns desses estudos podem ser contestados, devido à tendência de recaídas da malária *vivax*, em decorrência da liberação de hipnozoítos do fígado para a circulação, que podem ocorrer semanas a anos após a infecção original (Whitby, 1997).

Em circunstâncias raras e pouco conhecidas, a malária *vivax* pode se apresentar em formas graves e até letais (Mendis et al., 2001). Esses casos estão associados a alterações hematológicas (plaquetopenia, coagulação intravascular disseminada, sangramento), lesões pulmonares, alterações renais, ruptura esplênica, malária cerebral, entre outras (Alecrim, 2000).

A maioria dos negros do Oeste da África e da América é resistente à infecção por *P. vivax*, embora sejam suscetíveis às outras espécies de malária humana (Welch et al., 1977). A base genética dessa resistência é o genótipo correspondente ao grupo sanguíneo Duffy negativo (Miller et al., 1976). Esse genótipo está presente em 90% dos negros do Oeste da África e 70% dos negros americanos, sendo extremamente raro em outros grupos raciais. Indivíduos que não expressam esse grupo sanguíneo estão protegidos da infecção por *P. vivax* (Spencer et al., 1978).

Os determinantes antigênicos, presentes nos indivíduos Duffy positivos, são receptores para a ligação dos merozoítos às hemácias no processo da invasão (Miller et al., 1976). Os merozoítos da malária *vivax* invadem preferencialmente, se não exclusivamente, reticulócitos, tanto *in*

vivo (Kitchen, 1938), quanto *in vitro* (Mons et al., 1988), embora a glicoproteína do grupo Duffy positivo esteja presente tanto em hemácias maduras, como em reticulócitos (Galinsky et al., 1992). Essas limitações de invasão de *P. vivax* levaram à descoberta de duas famílias de receptores no parasito (Miller et al., 2002).

A molécula ligante do parasito para o receptor Duffy, chamada DBP (*Duffy binding protein*), pertence à família de proteínas ligantes a eritrócitos, cuja região extracelular contém dois domínios conservados ricos em cisteína e resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Adams et al., 1992; Tsuboi et al., 1994; Chitnis, 2001). A outra família corresponde às proteínas do parasito que se ligam aos reticulócitos (Miller et al., 2002). Foram identificadas duas proteínas (*PvRBP-1* e *PvRBP-2*), localizadas no pólo apical dos merozoítos de *P. vivax*, que aderem especificamente aos reticulócitos e devem ser responsáveis pelo reconhecimento durante a invasão (Galinski et al., 1992). Portanto, o processo de invasão consta de vários passos e necessita de uma série de interações moleculares altamente específicas. A junção irreversível forma-se apenas quando o merozoíto encontra um reticulócito, pois a ligação de *PvRBP-1* e *PvRBP-2* aos receptores do reticulócito deve funcionar como um sinal para a translocação da DBP dos micronemas para a superfície do merozoíto (Chitnis, 2001).

2. EPIDEMIOLOGIA

A malária é a antroponose de maior prevalência no mundo, ocorrendo entre 350 e 500 milhões de casos clínicos por ano a maioria causada por *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, que são as espécies de maior distribuição no mundo (Korenromp, 2004). *P. falciparum* causa uma mortalidade estimada em mais de um milhão de pessoas, contribuindo indiretamente para outras mortes, principalmente em crianças abaixo de 5 anos e mulheres grávidas, através do sinergismo com outras doenças e infecções, entre elas HIV/AIDS (OMS, 2005). Cerca de 60% dos casos clínicos de malária e 80% das mortes ocorrem na África ao Sul do Saara (OMS, 2003). A malária mata, em média, uma criança a cada 30 segundos.

No final de 2004, 107 países e territórios possuíam áreas de risco para a transmissão de malária, onde 3,2 bilhões de pessoas estavam expostos à infecção (OMS, 2005). Na **figura 2** encontram-se os mapas de risco para *P. falciparum* e *P. vivax* no ano de 2005, construídos a partir de várias fontes de informação, conforme descrito por Guerra et al., 2006.

Figura 2. Distribuição mundial de *P. falciparum* (a) e *P. vivax* em 2005 (b) (Guerra et al., 2006).

Dados de 2001 estimavam que 70 a 80 milhões dos casos de malária no mundo eram devidos a *Plasmodium vivax*, principalmente no Oriente Médio, Ásia e Oeste do Pacífico (80 a 90%), América do Sul e Central (10 a 15%) (Mendis et al., 2001). Provavelmente, de 10 a 20% dos casos de malária *vivax* no mundo ocorrem na África. No leste e sul da África, *P. vivax* representa 10% dos casos e na África Central e Oeste, menos de 1% dos casos. Excluindo-se a África, *P. vivax* é responsável por 56% dos casos de malária.

Nas Américas, *P. vivax* está presente em 19 países, desde a costa sul do México até a Amazônia brasileira, onde representa a espécie mais prevalente representando 71% dos casos de malária da região (OPAS, 2003).

Em várias regiões endêmicas, a situação da malária tem se mantido estável ou piorado devido à descentralização dos programas de controle, falta de planejamento, treinamento ou recursos financeiros suficientes para manter a infra-estrutura de saúde necessária (Gusmão, 1999). Além disso, as mudanças climáticas, instabilidade política e migrações têm facilitado a difusão da infecção para regiões sem malária e para populações não-imunes.

No Brasil, o combate à malária foi iniciado em 1923 (FUNASA – Boletim Epidemiológico, 1999). Na década de 1940, estima-se que ocorriam seis milhões de casos anuais (FSESP – Boletim Epidemiológico, 1983). No ano de 1960, devido às ações da Campanha de Erradicação da Malária, houve uma diminuição no número de casos detectados, com uma média de 80.000, entre 1960 e 1969 (FUNASA – Boletim Epidemiológico, 1999). Conseguiu-se interromper a transmissão da infecção nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e parte da região Centro-Oeste.

A partir da década de 70, o incentivo ao desenvolvimento da Região Amazônica acelerou o processo migratório, atraindo milhões de moradores de outras regiões do país, sem contato prévio com a malária, para as áreas endêmicas (FUNASA – PIACM, 2000, 2002). O número de

casos de malária aumentou de 52.469 em 1970, para 154.215 em 1979. Essa tendência de aumento foi se acentuando nos anos 80, chegando a 577.520 em 1989, mantendo-se estável na década de 90, com uma média de 520.000 casos anuais (FUNASA – Boletim Epidemiológico, 1999). A tendência de queda observada em 2001-2002 sofreu uma reversão em 2003, chegando a 597.907 casos notificados em 2005 (Ministério da Saúde, 2006).

No decorrer dos anos, foi observada a tendência de concentração progressiva da malária na Amazônia Legal, que é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão, passando de 94,9% dos casos em 1980 para 99,5% em 2004 (Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2005). O grande fluxo migratório da Região Amazônica para outros estados brasileiros, com potencial malarígeno, tem levado, nos últimos anos, ao surgimento de surtos de malária, como registrado recentemente no Paraná, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Ceará, Minas Gerais e Bahia.

Observou-se, também, um aumento do número de casos de malária por *P. vivax*, em relação a *P. falciparum*. Assim, em 1988, *P. falciparum* representava 50% dos casos. Em 1989, *P. vivax* foi responsável por 53% dos casos de malária. Essa porcentagem foi aumentando nos anos subsequentes, chegando a 80,7% dos casos de malária em 1999 (Alecrim, 2000). Entretanto, no período de 1999 a 2004 houve um aumento na proporção de malária por *P. falciparum* de 18,6% para 23,7%. Este aumento

é preocupante, pois a malária *falciparum* é a responsável pela grande maioria das formas graves e dos óbitos (Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2005).

3. IMUNIDADE

Durante muito tempo pensou-se que a imunidade naturalmente adquirida à malária deveria ser de algum modo deficiente, pois são necessárias múltiplas infecções para se atingir a proteção clínica e, geralmente, os parasitas não são eliminados completamente (Achtman et al., 2005). É comum encontrarem-se infecções persistentes. Quando um indivíduo imune sai de uma área endêmica ou mesmo quando a transmissão da malária diminui ou é interrompida por medidas de controle a imunidade parece tornar-se menos eficiente ou até desaparecer (Struik e Riley, 2004).

Em indivíduos previamente expostos à malária, mesmo após muitos anos, os mecanismos que controlam o crescimento do parasito e protegem contra a malária grave podem persistir na ausência de re-infecção, pois a recuperação dessas pessoas é muito mais rápida e tem um risco de morte muito menor do que em indivíduos que se infectam pela primeira vez. Porém, as manifestações clínicas durante as re-infecções não são minimizadas (Jelinek et al., 2002). Parece que a persistência do antígeno é necessária para a manutenção de altos níveis de anticorpos circulantes e de

outras células efectoras, mas as células B e T de memória permanecem na ausência do antígeno (Gray, 2002).

Há várias evidências de que a infecção malárica induza memória imunológica de curta duração. Esta hipótese vem sendo reforçada por estudos que mostram que ocorre uma intensa apoptose de células T durante a infecção. Além disso, as hemácias infectadas por esquizontes têm um efeito supressor sobre a função das células dendríticas. Na **tabela 1** encontra-se um resumo dos mecanismos efetores da imunidade à malária em indivíduos residentes em áreas endêmicas (Struik e Riley, 2004).

Os dados sobre a longevidade da resposta imune são escassos e controversos. Estudos da resposta de anticorpos associados com proteção revelam que a resposta pode ser de curta ou longa duração dependendo do grau de parasitemia e da persistência do parasito. A resposta imune de curta duração pode ser induzida pela interação dos mecanismos regulatórios normais do sistema imune e evasão imune do parasito (Achtman et al., 2005).

Nas regiões onde a transmissão de *P. vivax* é relativamente alta, observa-se a aquisição de imunidade protetora, ou imunidade clínica, entre os 10 e 15 anos de idade (Cattani et al., 1986). Na maioria das outras regiões em que *P. vivax* é prevalente, a doença afeta pessoas de todas as idades, tanto adultas como crianças, pois a transmissão é baixa ou moderada, sendo insuficiente para induzir nas populações o desenvolvimento de um alto grau de imunidade protetora efetiva contra o

parasito (Mendis et al., 2001) e sendo encontrados diferentes graus de imunidade. Deste modo, os sintomas agudos da malária *vivax*, como por exemplo, febres, dores no corpo e de cabeça, podem diminuir significativamente após sucessivos episódios de malária em um período de poucos meses (Gunewardena et al., 1994). Alguns estudos indicam que *P. vivax* confere alguma proteção clínica contra infecções por *P. falciparum* (Gunewardena et al., 1994), enquanto que outros resultados sugerem que tal proteção não ocorra (Collins e Jeffery, 1999).

As células TCD4⁺ desempenham um papel importante na resposta imune à malária, tanto na cooperação com as células B para a produção de anticorpos, como na produção de citocinas, que amplificam a fagocitose e eliminação do parasito e também na autolimitação da resposta imune (Stephens e Langhorne, 2006).

Estudos recentes (Jangpatarapongsa et al., 2006) mostram que durante a fase aguda da infecção por *P. vivax*, há altos níveis de células T imaturas (TCD4⁺) e de memória (TCD4⁺CD45RO⁺), sugerindo que as células T de memória não são suprimidas pelo parasito. Embora haja um aumento na expressão de células TCD8⁺ de memória, os níveis totais de TCD8⁺ não estão elevados, indicando que embora as células TCD8⁺ não estejam em expansão, elas podem ser ativadas durante a infecção aguda por *P. vivax*. Por outro lado, na infecção por *P. falciparum* a porcentagem de células TCD8⁺ é menor que na infecção por *P. vivax* (Srisurapanon et al., 2003) provavelmente devido ao maior efeito supressor de *P. falciparum*.

Tabela 1. Mecanismos efetores da imunidade à malária em indivíduos residentes em áreas endêmicas (Struik e Riley, 2004).

Mecanismos efetores prováveis	Contribuições prováveis a imunidade protetora em humanos	Resposta de Memória
Anticorpos bloqueiam a invasão de esporozoítos nos hepatócitos.	Mínima, pois a passagem dos esporozoítos pelo fígado é muito rápida; não há evidências que estes anticorpos conferem proteção em estudos de campo.	É necessária uma estimulação antigênica regular para manter altos níveis de anticorpos; um problema potencial em áreas de transmissão baixa ou epidêmica.
IFN- γ e Células TCD8 ⁺ inibem o desenvolvimento do parasito e destroem hepatócitos infectados.	Contribuição potencialmente importante para imunidade induzida por vacinas, porém pouca evidência de imunidade pré-eritrocítica naturalmente adquirida.	Dados de estudos de vacina sugerem que os níveis celulares caem muito rápido; sugerem que antígenos persistentes podem ser necessários para manter altos níveis de efetores.
Anticorpos bloqueiam a invasão dos merozoítos nos eritrócitos.	Contribuição importante na imunidade induzida por vacinas, dados de campo sugerem que tais anticorpos podem controlar a densidade de parasitas.	É necessário uma estimulação antigênica ou uma infecção crônica para manter os altos níveis de anticorpos (premunição) = um problema em áreas de transmissão baixa ou epidêmica.
Anticorpos facilitam a fagocitose de eritrócitos infectados ou merozoítos livres.	Contribuição importante na imunidade induzida por vacinas, dados de campo sugerem que tais anticorpos podem controlar a densidade de parasitas.	É necessária uma estimulação antigênica ou uma infecção crônica para manter os altos níveis de anticorpos (premunição); os antígenos alvo são polimórficos.
IFN- γ e Células TCD4 ⁺ de memória ativam os macrófagos para a fagocitose de parasitos intra-eritrocíticos e merozoítos livres.	Dados em modelos animais indicam um papel importante na proteção; em humanos, o IFN- γ se correlaciona com proteção contra infecção (porém, risco aumentado de doença quando infectado).	É necessário um balanço cuidadoso para promover a eliminação do parasito sem induzir patologia (células T regulatórias?). Poucas células TCD4 ⁺ ativadas no sangue total.
Anticorpos neutralizam o glicofosfatidilinositol do parasito e inibem a indução da cascata de citocinas inflamatórias.	Evidência experimental, porém os dados de campo não são convincentes.	A flutuação sazonal nos anticorpos anti-GPI, sugerem que a resposta é de curta duração; a indução dos anticorpos parece ser não dependente de células T. Portanto, com pouco efeito <i>booster</i> , maturação de afinidade e <i>switching</i> de classes.
Anticorpos impedem o seqüestro de eritrócitos infectados, impedindo sua ligação ao endotélio.	Contribuição importante na imunidade induzida por vacinas; dados de campo sugerem que tais anticorpos podem proteger contra malária cerebral.	Antígenos alvo são altamente polimórficos, anticorpos altamente cepa-específicos, problema para o efeito <i>booster</i> .
Anticorpos mediam a lise dependente de complemento de gametas extracelulares, impede a fertilização e desenvolvimento em zigotos.	Contribuição importante na imunidade induzida por vacinas; dados de campo sugerem que tais anticorpos podem reduzir a transmissão.	Antígenos alvo conservados, portanto a memória deveria ser boa, porém há relatos de aumento na transmissão quando o nível de anticorpos cai.

Em indivíduos não-imunes, a ruptura dos esquizontes está associada com uma série de patologias no hospedeiro, que vão de febre moderada até doença em órgãos múltiplos (Kwiatkowski, 1999). A lise das hemácias infectadas desencadeia uma cascata de respostas inflamatórias, que podem ser letais, se não forem controladas. As citocinas liberadas desencadeiam os sintomas clássicos do paroxismo malárico e contribuem para controlar a replicação do parasito (Stevenson e Riley, 2004). As formas eritrocitárias do parasito estimulam uma resposta imune celular e humoral, porém os esporozoítos, parasitos do ciclo pré-eritrocítico e gametócitos são, provavelmente, pouco imunogênicos (Matzinger, 2002), sendo os seus antígenos de superfície menos polimórficos que os das formas sanguíneas, o que sugere uma pressão seletiva menor de evasão da resposta imune (Struik e Riley, 2004). De um modo geral, a proteção contra os sintomas da doença que se observa na imunidade naturalmente adquirida é altamente benéfica para o indivíduo, porém tem pouco efeito na transmissão da malária, pois mesmo os imunes podem apresentar parasitemia.

O desenvolvimento e implementação de uma vacina eficiente e segura são prioridades, que apesar dos esforços de 3 décadas de estudos, estão ainda para ser conquistados.

4. PROTEÍNA 1 DE SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTO – MSP1

Vários estágios do ciclo do parasito vêm sendo investigados como alvos em potencial para o desenvolvimento de vacinas (Good, 2005). Uma das candidatas mais importantes para o desenvolvimento de uma vacina contra as formas eritrocitárias de *P.falciparum* e *P. vivax* é a proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP1), com 180 a 230 kDa, que está presente em todas as espécies de *Plasmodium* (Holder, 1988; Hirunpetcharat, 1997), pois seus determinantes conservados são importantes no desenvolvimento da imunidade (Hui et al., 1996; Good, 2005).

Estudos feitos em *P. falciparum* mostraram que a MSP1 (*Pf*MSP1) tem aproximadamente 200kDa e é o precursor de várias proteínas importantes da superfície dos merozoítos (Holder et al., 1987; McBride e Heidrich, 1987; Blackman et al., 1991). É sintetizada durante a esquizogonia como uma proteína única presa à membrana plasmática do parasito por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Durante o desenvolvimento do merozoíto, o precursor é clivado por proteases em quatro fragmentos principais, MSP1₈₃, MSP1₂₈, MSP1₃₈ e MSP1₄₂, que ficam presos, sob a forma de um complexo de polipeptídeos, na superfície do parasito, pelo fragmento de 42kDa ligado à porção GPI C-terminal (MSP1₄₂). Quando o merozoíto é liberado, o fragmento MSP1₄₂ ligado à membrana sofre uma clivagem proteolítica secundária (Blackman et al., 1991a; Miller et al., 1993). O produto de clivagem MSP1₃₃ da região NH2 terminal é solúvel, sendo

liberado junto com o restante do complexo (Blackman e Holder, 1992), enquanto o fragmento MSP1₁₉ da região COOH terminal permanece na superfície do merozoíto durante a invasão e é carregado para a nova hemácia invadida (Blackman et al., 1990,1991a; Blackman, 1994).

A *Pf*MSP1₁₉ consiste de dois domínios, cada um com seis resíduos de cisteína, altamente conservados, que são semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF) (Blackman et al., 1991b; Morgan et al., 1999). A **figura 3** apresenta um esquema do processamento secundário da *Pf*MSP1.

Figura 3. Esquema do processamento secundário da MSP1 de *P.falciparum*. **A:** Complexo de quatro polipeptídeos de 83, 30, 38 e 42 kDa presentes na superfície do merozoíto recém-liberado. A porção de 42 kDa (derivada da porção C-terminal do precursor) está ligada à membrana através de uma âncora de fosfatidilinositol. **B:** No momento da invasão, a clivagem da MSP1₄₂ produz MSP1₃₃ e MSP1₁₉ e libera o complexo da superfície do merozoíto (Blackman et al., 1994).

A clivagem secundária da MSP1 é conservada no gênero *Plasmodium* e se completa invariavelmente quando um merozoíto invade com sucesso uma hemácia, indicando ser necessária para o processo da invasão (Blackman et al., 1993, 1996). Anticorpos monoclonais que impedem a invasão ligam-se à MSP1 na região C-terminal dos domínios EGF (Chappel e Holder, 1993). Como a ligação desses anticorpos também inibe a clivagem secundária do MSP1, foi proposta que a base do seu mecanismo protetor seja essa (Blackman et al., 1994). Estudos *in vitro* indicaram que a destruição eficiente do parasito envolve IgG₁ e IgG₃, mas não IgG₂ que normalmente é não citofílico (Chumpitazi et al., 1996).

Nwuba et al., 2002 apresentaram evidências que a infecção natural por *P. falciparum* induz anticorpos inibidores da clivagem secundária da MSP1 e anticorpos bloqueadores que podem abolir esses efeitos protetores (Holder et al., 1999), fornecendo um meio eficiente para evasão da resposta imune do hospedeiro pelo parasito. O efeito dos anticorpos bloqueadores pode explicar a ausência de associação entre níveis de MSP1₁₉ e proteção clínica (Dodoo et al., 1999), embora alguns autores tenham encontrado associação entre anticorpos anti-MSP1₁₉ e proteção contra malária (Riley et al., 1992; Branch et al., 1998; Okech et al., 2004).

Os merozoítos de *Plasmodium vivax* expressam uma proteína de superfície equivalente à *Pf*MSP1, conhecida como *Pv*MSP1 (Del Portillo et al., 1991). Porém, em comparação com *Pf*MSP1, há um menor número de estudos a respeito do processamento, destino dos fragmentos e resposta imune protetora da *Pv*MSP1, o mesmo ocorrendo com a sua

imunogenicidade (Sachdeva et al, 2004). Foi proposto que o seu mecanismo de processamento é semelhante ao do *PfMSP1* (Arévalo-Herrera e Herrera, 2001). Comparando-se as estruturas da *MSP1₁₉* de *P. falciparum*, *P. cynomolgi* e *P. knowlesi* verificou-se que são muito similares, havendo um compartilhamento de 82% entre este último e *P. cynomolgi* e 51% com *P. falciparum* (Garman et al., 2003).

Os genes de *MSP1* são compostos de 17 blocos, dos quais cinco são conservados e flanqueados por blocos semi-conservados ou variáveis. As variações na sequência são dimórficas na maior parte dos genes com exceção de uma região polimórfica no bloco 2 (Tanabe et al., 1987; Peterson et al., 1998). Jongwutiwes et al., 1993 analisaram as variações nas seqüências dos blocos 13 a 17 da região C-terminal de isolados colhidos de área endêmica para malária, observando a ocorrência de poucas variações nessa região.

O gene que codifica a *PvMSP1* é dimórfico, tendo sido identificadas duas formas, de Belém, tipo 1 (Del Portillo et al., 1991) e de Salvador, tipo 2 (Gibson et al., 1992). Um terceiro tipo de alelo (tipo 3) foi encontrado em isolados de Sri Lanka, Colômbia, Brasil, Tailândia, Coreia e China, tendo-se sugerido que este alelo resultou da recombinação intragênica dos alelos de Belém e Salvador (Lim et al., 2000; Gutierrez et al., 2000). Até o momento poucos estudos têm sido feitos sobre as características genéticas de *P. vivax* que circulam nas regiões endêmicas diferentes (Maestre et al., 2004). Na **figura 4** há uma representação esquemática do gene *msp-1* de *P. vivax*.

Figura 4. Representação esquemática do gene MSP1 de *P. vivax*. Os retângulos representam blocos conservados inter-espécies (ICBs), blocos conservados (CBs). Os blocos variáveis estão em branco (Maestre et al., 2004).

O gene que codifica a MSP1₁₉ de *P. vivax* tem várias similaridades com os genes de outras espécies de *Plasmodium*, como se observou com *P. falciparum* e *P. yoelii* que possuem 10 blocos conservados entre as espécies, alternando com regiões de maior diversidade (Cooper, 1993, Del Portillo et al., 2001).

A partir da determinação da estrutura primária do gene que codifica a PvMSP1, várias proteínas recombinantes, baseadas nas seqüências que codificam as regiões N ou C-terminais da molécula, foram expressas em diferentes vetores (Cunha et al., 2002; Soares e Rodrigues, 2002; Sachdeva et al., 2004).

Estudos sobre a resposta imune naturalmente adquirida contra a PvMSP1 foram realizados em áreas endêmicas de malária, no Brasil

(Levitus et al., 1994; Soares et al., 1997; Soares et al., 1999a; Soares et al., 1999b; Rodrigues et al., 2003; Morais et al., 2005; Nogueira et al., 2006), Colômbia (Espinosa et al., 2003) e na Coréia do Sul (Park et al., 2001; Kim et al., 2003). Esses estudos demonstraram que a região C-terminal (MSP1₁₉) é a mais imunogênica da molécula e que os anticorpos específicos estão associados com episódios recentes de malária.

5. AVIDEZ E AFINIDADE

A eficiência na prevenção ou controle de uma infecção depende tanto da quantidade como da qualidade dos anticorpos induzidos pela resposta imune humoral. Entre os fatores qualitativos, a afinidade desempenha um papel muito importante na suscetibilidade ou não a certas doenças (Pullen et al., 1996; Chargelegue et al., 1993; Stewart e Chargelegue, 1996).

Vários estudos de afinidade têm sido realizados (Lappalainen e Hedman, 2004), sendo uma ferramenta muito importante para o diagnóstico de várias infecções (Hedman et al., 1989; Mechain et al., 2000; Lazzarotto et al., 2001), no estudo de novas vacinas (Pullen et al., 1986; Granoff et al., 1998) e na resposta à imunização em pacientes imunocomprometidos (Mechain et al., 2000).

A afinidade dos anticorpos secretados aumenta com o desenvolvimento da resposta imune, fenômeno denominado maturação da afinidade, decorrente da mutação somática dos linfócitos B estimulados pelo

antígeno. Esse mecanismo gera estruturas novas nos domínios variáveis (V), algumas das quais se ligam ao antígeno com maior afinidade que os domínios V originais. As células B produtoras de anticorpos de maior afinidade são preferencialmente estimuladas a cada nova exposição ao antígeno. Essas mudanças ocorrem apenas na estrutura das regiões V dos anticorpos, com conseqüentes alterações na especificidade fina, sem mudar as regiões constantes (C) e as funções efetoras dos anticorpos (Abbas e Lichtman, 2005).

Afinidade é uma expressão termodinâmica que descreve a soma das forças de atração e de repulsão não-covalentes, resultantes da interação entre o sítio de combinação do anticorpo e o epítopo de um antígeno, no ponto de equilíbrio (Steward e Chargelegue, 1996; McCloskey et al., 1997). Nesse ponto é estabelecido um equilíbrio dinâmico em que a taxa de associação é igual à taxa de dissociação. A afinidade é representada pela constante de dissociação (K_d) que indica a concentração de antígeno necessária para ocupar metade dos sítios de combinação dos anticorpos, presentes na solução. Um valor baixo de K_d indica alta afinidade. Em uma resposta humoral típica, o valor de K_d varia de 10^{-7} M, nas respostas primárias a 10^{-11} M ou menos, nas secundárias (Abbas e Lichtman, 2005).

A afinidade pode ser determinada experimentalmente pelos métodos de equilíbrio de diálise, inibição ou aumento de fluorescência, radioimunoensaio de competição ou tecnologia de biosensores, sendo

necessário que as soluções devem conter preparações puras tanto do antígeno como do anticorpo (Steward e Chargelegue, 1996).

Na prática, é comum encontrar interações polivalentes entre antígenos que têm mais de uma cópia do determinante e os anticorpos, cujo número de sítios de ligação pode ser de dois (IgG) a 10 (IgM). Nestes casos, a força total de ligação é chamada de avides ou afinidade funcional, que é muito maior que a soma das afinidades de cada ligação (Hornick e Karush, 1972; Gerber, 2002). Matematicamente, a avides aumenta quase em razão geométrica em relação ao número de sítios combinação (Abbas e Lichtman, 2005).

A avides pode ser medida por dois tipos de ensaios de fase sólida, inibição da competição e eluição. Os testes de eluição, como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), empregam agentes caotrópicos ou desnaturantes, para separar a ligação antígeno-anticorpo.

O teste ELISA tem sido muito empregado na avaliação da avides de anticorpos IgG, empregando agentes dissociantes como uréia (Hedman et al., 1989; Jenum et al., 1997; Robertson et al., 2003), tiocianato (Ferreira e Katzin, 1995; McCloskey et al., 1997; Gerber, 2002) ou dietilamina (Thomas e Morgan-Capner, 1991; Thomas, 1997).

A medida da avides usando o teste ELISA e a uréia com agente caotrópico, baseia-se na eluição diferencial de IgG do antígeno imobilizado na placa; anticorpos de baixa avides se dissociam do antígeno, enquanto que anticorpos de alta avides permanecem ligados ao antígeno (Hedman et

al., 1989). Geralmente, a avidéz é expressa como índice de avidéz (IA), que é uma medida relativa, podendo variar em função das condições do ensaio (Butler, 2000) e do método de cálculo. Vários modelos de cálculo de IA foram descritos, tais como cálculo do IA ao ponto do limiar de reatividade (Hedman et al., 1989; Jenum et al., 1997), através de curva padrão (Prince e Wilson, 2001), através de regressão polinomial de segundo grau (Ferreira e Katzin, 1995) ou mesmo métodos com uma (Thomas e Morgan-Capner, 1991) ou duas diluições da amostra (Prince & Leber, 2002).

Os estudos de avidéz têm sido aplicados ao diagnóstico de doenças causadas por protozoários, vírus e bactérias, permitindo diferenciar infecção primária de infecção crônica. Pacientes com infecção primária por *Toxoplasma gondii* apresentam anticorpos de baixa avidéz, enquanto que nas infecções crônicas os anticorpos apresentam alta avidéz (Hedman et al., 1989, Camargo, 1991).

Os estudos de avidéz na malária têm apresentado resultados variados. Ferreira et al., 1996 avaliaram a avidéz de anticorpos específicos para as formas eritrocitárias de *Plasmodium falciparum* em população de área endêmica com transmissão estável na África e transmissão instável na Amazônia Brasileira. Encontraram anticorpos da classe IgG₁ de alta avidéz, em africanos e anticorpos de baixa avidéz durante a fase aguda da doença em pacientes da Amazônia. Leoratti, 2004 estudou a resposta imune humoral em pacientes da região endêmica de Mato Grosso, verificando o predomínio de IgG, IgG₁, IgG₂ de alta avidéz e IgG₃ de baixa avidéz, nos

indivíduos assintomáticos ou sem complicações clínicas. Nos indivíduos com malária complicada, encontrou predomínio de IgG₄, IgE e IgM.

6. RACIONAL DO ESTUDO

Estudos empregando o antígeno recombinante baseado na MSP1₁₉ de *P. vivax*, mostraram que é altamente imunogênico durante a infecção no homem, sendo reconhecido por anticorpos e células T de uma grande porcentagem de indivíduos brasileiros recentemente expostos à malária (Soares et al., 1997, 1999). Resultados semelhantes foram obtidos na Coreia, onde mais de 90% dos indivíduos infectados possuíam anticorpos anti-PvMSP1₁₉ (Park et al., 2001). Cunha et al., 2002, sugerem o teste ELISA com a proteína recombinante da PvMSP1₁₉ como base para o desenvolvimento de um ensaio para a detecção de malária por *P. vivax*, sendo um marcador de exposição ao parasito.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar a resposta imune, quanto ao nível e à avidéz dos anticorpos IgG, dirigidos contra a proteína recombinante derivada da Proteína 1 de Superfície de Merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP1₁₉) em indivíduos residentes em diferentes regiões do Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Padronizar o ensaio imunoenzimático para a pesquisa de anticorpos IgG anti-PvMSP1₁₉.
- b. Avaliar o desempenho do teste nos grupos de indivíduos com diagnóstico conhecido.
- c. Estudar o cálculo do índice de avidéz de anticorpos IgG anti-PvMSP1₁₉.
- d. Relacionar níveis e avidéz de anticorpos à presença ou não de infecção, ao tempo decorrido desde o último episódio de malária, ao número de episódios e ao grau de exposição à malária.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

Neste estudo foram testadas amostras de soro de indivíduos com as seguintes características clínicas:

1.1. SOROS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS POR *P. VIVAX* PROCEDENTES DA REGIÃO AMAZÔNICA

1.1.1. BELÉM, PA

Foram analisadas amostras de soro de 50 residentes no Município, com gota espessa positiva para *P. vivax*, sendo 33 com primo infecção e 17 que haviam apresentado episódios de malária anteriormente à coleta. Entre estes, um era assintomático.

As amostras foram colhidas de pacientes atendidos no Instituto Evandro Chagas da Fundação Nacional de Saúde, em Belém, PA, no ano de 1997.

Em 1996, haviam sido examinadas 25.374 lâminas, das quais 2.716 foram positivas para malária (IPA=2,37/1.000) e em 1997, das 29.712 lâminas examinadas, 2.075 foram positivas (IPA=2,34/1.000). A espécie

predominante foi *P. vivax* com 94,9% e 96,8% de positividade, em 1996 e 1997, respectivamente.

1.1.2. IGARAPÉ-AÇU, PA

Foram testadas amostras de soro de 71 pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax*, sendo 67 com primo infecção e quatro que haviam apresentado episódios de malárias anteriores. Todos apresentavam sintomas.

Em 1996, haviam sido examinadas 1.571 lâminas, das quais 134 foram positivas para malária (IPA=4,37/1.000) e em 1997, das 2.787 lâminas examinadas, 384 foram positivas (IPA=12,11/1.000). A espécie predominante foi *P. vivax* com 97,0% e 99,7% de positividade, em 1996 e 1997, respectivamente.

1.2. SOROS DE MORADORES DE ALTA FLORESTA, MT

1.2.1. CARACTERÍSTICAS DO MUNICÍPIO À ÉPOCA DAS COLETAS

O município de Alta Floresta localiza-se na Amazônia Legal mato-grossense a 765 km de Cuiabá. Na época das coletas, possuía uma área de 19.605 km² e uma população, segundo estimativa de 01 de julho de 1994,

de 74.238 habitantes. A área rural estava dividida em 108 comunidades, compreendendo 55% do total da população. As atividades rurais compreendem a pecuária e a agricultura com plantações de cacau, guaraná, café, feijão, banana, arroz, milho etc. Na região ainda há alguns garimpos, nas propriedades particulares. O clima é quente e úmido, com temperaturas elevadas, podendo atingir mais de 40°C. A média anual fica em torno de 24°C. Os meses de abril a agosto/setembro são secos e os de setembro/outubro a março são meses de chuva.

Em 1995, foram examinadas 19.061 lâminas, das quais 5.396 foram positivas para malária (IPA=67,80/1.000) e em 1996, das 15.170 lâminas examinadas, 4.118 foram positivas (IPA=70,77/1.000). A espécie predominante foi *P. vivax* com 68,4% de positividade nos 2 anos consecutivos, seguida por *P. falciparum*, com 30,9% e 30,3%, em 1995 e 1996, respectivamente. A **figura 5** mostra um mapa de Alta Floresta, esboçado a partir das leis que delimitavam as divisas do município.

1.2.2. AMOSTRAS COLETADAS

As amostras de sangue dos moradores das áreas rurais de Alta Floresta foram coletadas em três períodos. A primeira coleta foi realizada entre 10 e 17 de maio de 1995, a segunda de 22 de novembro a 2 de dezembro de 1995 e a terceira de 10 a 22 de maio de 1996.

Figura 5. Mapa do município de Alta Floresta, MT com a indicação das 5 regiões estudadas: 1 = 4061, 2 = 4062, 3 = 4063, 4 = 4064, 5 = 4065. (Fonte: Secretaria do Meio Ambiente, Obras, Viação e Urbanismo de Alta Floresta).

A seleção da amostragem da população foi feita tomando-se como referência as cinco regiões da área rural, estabelecidas pela Fundação Nacional de Saúde - Coordenadoria Regional de Mato Grosso - Distrito Técnico Administrativo de Sinop - IV MT.

As comunidades visitadas nas regiões 4061 e 4062 localizam-se em área que foi desmembrada de Alta Floresta e hoje é o município de Carlinda, situando-se no extremo leste do município. As regiões 4063 e 4064 abrangiam localidades situadas, respectivamente, a oeste e leste do núcleo

urbano. A região 4065 compreendia a área dos garimpos, localizando-se ao sul do município, em terras que anteriormente pertenciam à Nova Canaã do Norte. Atualmente, não há garimpos na região.

As 1.074 amostras de soros de residentes no município foram classificadas conforme os seguintes critérios:

- Região da residência do indivíduo: 4061 (n=233), 4062 (n=198), 4063 (n=203), 4064 (n=211), 4065 (n=229).
- Tempo decorrido desde a última malária: Med = 1,5 anos.
- Número de episódios de malária: Med = 3.
- Gota espessa positiva no momento da coleta: *P. falciparum* (n=8), sendo quatro com primo infecção, *P. vivax* (n=14), sendo um com primo infecção e um com infecção mista por ambas as espécies de plasmódio.
- Moradores que não têm ou tiveram malária (n=501).
- Tempo de permanência em área endêmica para malária: Med = 9,0 anos.

1.3. SOROS DE PACIENTES ATENDIDOS NA SUCEN

As amostras foram gentilmente cedidas pela Dra. Sílvia Maria di Santi, Chefe do Laboratório de Malária da SUCEN.

Os pacientes eram procedentes dos estados de Rondônia, Mato Grosso e Pará, e estavam em trânsito na cidade de São Paulo.

1.3.1. COM PRIMO INFECÇÃO

Foram analisadas amostras de soro de 12 pacientes com primo infecção por *P. vivax* e 20 por *P. falciparum*.

1.3.2. ACOMPANHAMENTO PRÉ E PÓS-TERAPÊUTICO

Foram analisadas 25 amostras de soro de 13 pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax*, sendo nove com primo infecção e quatro que já haviam tido episódios anteriores de malária. As amostras foram colhidas antes e após o tratamento, nos tempos: T0 = inicial, T1 = 15 dias, T2 = 1 mês e T3 = 6 meses.

Os pacientes eram residentes em diferentes regiões, como: São Paulo-SP, Mauá-SP, Embu-SP, Porto Velho-RO e Belém-PA. Contraíram malária em sítios e fazendas próximas de suas cidades ou em viagens para a cidade de Manaus-AM.

1.4. SOROS DE INDIVÍDUOS COM OUTRAS PATOLOGIAS NÃO RELACIONADAS À MALÁRIA

Foram testadas amostras de sangue com outras patologias ou anticorpos heterólogos: fator antinúcleo (n=10), sífilis (n=7), toxoplasmose (n=6), mononucleose (n=12), doença de Chagas (n=6), leishmaniose

mucocutânea (n=5), leishmaniose cutânea (n=5), fator reumatóide (n=26), com o objetivo de verificar a existência de reatividade cruzada no ensaio. Os soros foram gentilmente cedidos pelo laboratório Fleury.

1.5. SOROS DE INDIVÍDUOS DOADORES DE BANCO DE SANGUE

Foram testadas 100 amostras de doadores da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, que nunca estiveram em área endêmica de malária ou em contato com a doença.

1.6. SOROS DE FUNCIONÁRIOS DO LABORATÓRIO

Foram analisadas 25 amostras de indivíduos do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

1.7. SOROS-PADRÃO

Foram empregadas amostras de soros padrão positivo (n=3) e negativos (n=3) para anticorpos IgG específicos para *P. vivax*. O soro

padrão positivo utilizado na padronização inicial foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Irene da Silva Soares.

2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todas as amostras de soro que foram analisadas no estudo encontram-se estocadas no laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia de IMTSP e foram colhidas, mediante consentimento informado do paciente, para realização de pesquisas afins.

Segundo parecer da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da FMUSP, nenhuma objeção deve ser feita à utilização de material biológico estocado, originalmente colhido no contexto de pesquisas afins com o atual projeto, desde que garantida a preservação rigorosa do anonimato dos indivíduos originalmente envolvidos e a conservação e utilização eticamente corretas do material, bem como das informações obtidas a partir dele.

Esclarecemos que todas as amostras de sangue que foram coletadas no presente projeto obedeceram aos critérios estabelecidos pela resolução número 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

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 coletar sangue por punção venosa. Também foi assegurado que se algum indivíduo se recusar a participar do estudo, não será discriminado ou punido por parte da Instituição de Saúde. As amostras de sangue foram coletadas somente após consentimento livre e esclarecido, e por escrito.

3. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO *PvMSP1₁₉*

A proteína recombinante derivada da região C-terminal (19 kDa) da Proteína 1 de Superfície do Merozoíto de *P. vivax* (*PvMSP1₁₉*) foi expressa em *Escherichia coli* a partir do vetor de expressão pET-14b em fusão com cauda de histidina (His₆-MSP1₁₉) (Cunha et al., 2001; Rodrigues et al., 2003). A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (1976).

O antígeno recombinante de *PvMSP1₁₉* foi cedido gentilmente pela Profa. Dra. Irene da Silva Soares do Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4. PESQUISA DE ANTICORPOS IGG ANTI-*PvMSP1*₁₉

4.1. PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO TESTE ELISA

Com base na técnica descrita por Rodrigues et al., 2003, foram testadas algumas modificações, avaliando-se os seguintes parâmetros: tempo e temperatura de sensibilização (*overnight* à TA e 2 horas a 37°C, seguida de *overnight* a 4°C), incubação das amostras (2 horas à TA e 30 min a 37°C), do conjugado (1 hora à TA e 30 min a 37°C) e do cromógeno (10 a 15 min à TA e 30 min a 37°C). Também se testou a concentração do cromógeno: 1,0 e 0,5 mg/mL de OPD, 1 e 0,4 µL de H₂O₂ e H₂SO₄ 4N e 2N. Foram testados dois conjugados diferentes, A6029 e A0170 da (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA), cada um em duas diluições. As reações foram realizadas em duplicata, com controle sem amostra, para cada soro padrão testado.

4.2. DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE REATIVIDADE (LR)

Para a determinação do limiar de reatividade foi utilizada a Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

4.3. CURVA ROC

A Curva ROC descreve quantitativamente o desempenho de um teste diagnóstico (Martinez et al., 2003), permitindo a determinação do ponto de corte ideal para se obter a sensibilidade e especificidade mais adequada. Na projeção do gráfico, o eixo da ordenada representa a sensibilidade e o da abscissa, os falsos positivos (um menos a especificidade). O ponto de corte ideal é aquele que estiver mais acima e próximo do eixo da ordenada. A área sobre a curva determina o desempenho do teste: o valor mínimo de 0,50, representado pela linha de 45^0 , determina que o teste não possui capacidade discriminatória entre indivíduos doentes e não doentes, ou seja, a taxa dos verdadeiros positivos equivale à de falsos positivos. O valor máximo de um, que corresponde ao teste perfeito, é capaz de detectar os verdadeiros positivos, não existindo falsos positivos. Considerou-se o desempenho excelente para a área sob a curva superior a 0,9, desempenho bom entre 0,7 e 0,9 e desempenho ruim entre 0,5 e 0,7 (Greiner et al., 2000; Martinez et al., 2003).

O Limiar de Reatividade (LR) das amostras reagentes com o antígeno recombinante PvMSP1₁₉ foi determinado utilizando-se como grupo controle (não infectados), amostras de soros de funcionários do laboratório (n=25), doadores de banco de sangue (n=100) e pacientes com outras patologias não relacionadas à malária (n=77). O grupo de infectados foi constituído por amostras de pacientes com malária diagnosticada pela gota

espessa positiva para *P. vivax*, sendo 50 soros de pacientes de Belém, 68 de Igarapé-Açu, 14 de Alta Floresta e 21 de pacientes atendidos na SUCEN.

Também foi determinado o LR utilizando-se como grupo controle somente as amostras de soro de indivíduos “saudáveis” (n=125).

4.4. CÁLCULO DO ÍNDICE DE REATIVIDADE (IR)

$$IR = \frac{\text{absorbância da amostra}}{LR}$$

Foram considerados reagentes as amostras de soro com $IR \geq 1,00$.

5. ESTUDO DA AVIDEZ DOS ANTICORPOS IgG ANTI-*PvMSP1*₁₉

A determinação do índice de avidéz foi realizada somente para as amostras com $IR \geq 1,00$. As amostras foram diluídas de 1/100 até 1/8.100, em razão três, sendo ensaiadas em duplicata. Após a incubação, uma das duplicatas foi lavada com uréia 8M por 5 minutos (100µL/cavidade). As demais etapas foram realizadas conforme as condições padronizadas.

5.1. CÁLCULO DO ÍNDICE DE AVIDEZ (IA)

Foram testados três métodos para determinação do IA.

5.1.1. CÁLCULO DO IA À PRIMEIRA DILUIÇÃO

Razão entre as absorbâncias com/sem uréia, na diluição de 1/100 (Thomas e Morgan-Capner, 1991).

$$IA = \frac{\text{Abs PBS}}{\text{Abs U}} \quad \text{Onde:}$$

Abs PBS = absorbância da duplicata lavada com PBS

Abs U = absorbância da duplicata lavada com uréia

5.1.2. CÁLCULO DO IA AO PONTO DO LIMAR DE REATIVIDADE

Razão entre os títulos com/sem uréia, determinados nas curvas de diluição, para cada amostra, no ponto do LR (Jenum et al., 1997).

$$IA = 10^{(U-P)} \quad \text{Onde:}$$

$$U = P = \frac{DO_X - 0,1}{DO_X - DO_Y} \times [(\log \text{diluição}_Y^{-1}) - (\log \text{diluição}_X^{-1})] + \log \text{diluição}_X^{-1}$$

Definiu-se: DO = absorbância

DO_X = absorbância na diluição_X

DO_Y = absorbância na diluição $_Y$

$0,1 = LR$

Diluição $_X$ = maior diluição cuja absorbância é $> 0,1$

Diluição $_Y$ = menor diluição cuja absorbância é $< 0,1$

Os valores de U e P foram calculados, respectivamente, nas curvas com e sem uréia (**figura 6**).

Figura 6. Exemplo de gráfico para cálculo do índice de avides, no ponto do Limiar de Reatividade (LR). Curvas de absorbância de amostras de soro, tratadas (U) e não tratadas (P) com uréia, correspondentes às diluições de 1/100 a 1/8.100 (razão 3).

5.1.3. CÁLCULO DO IA AO PONTO DE 50% DA ABSORBÂNCIA MÁXIMA COM URÉIA

Razão entre os títulos com/sem uréia, determinados nas curvas de diluição, para cada amostra, no ponto de 50% da absorbância máxima da curva com uréia.

$$IA = 10^{(U-P)} \quad \text{Onde:}$$

$$U = P = \frac{DO_X - DO_{50}}{DO_X - DO_Y} \times [(\log \text{diluição}_Y^{-1}) - (\log \text{diluição}_X^{-1})] + \log \text{diluição}_X^{-1}$$

Definiu-se: DO = absorbância

DO_X = absorbância na diluição_X

DO_Y = absorbância na diluição_Y

DO_{50} = 50% da absorbância máxima com uréia

Diluição_X = maior diluição cuja absorbância é > 50% da absorbância máxima da curva com uréia

Diluição_Y = menor diluição cuja absorbância é < 50% da absorbância máxima da curva com uréia

Os valores de U e P foram calculados, respectivamente, nas curvas com e sem uréia (**figura 7**).

Figura 7. Exemplo de gráfico para cálculo do índice de avidade, no ponto de 50% da absorbância máxima com uréia. Curvas de absorbância de amostras de soro, tratadas (U) e não tratadas (P) com uréia, correspondentes às diluições de 1/100 a 1/8100 (razão 3).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A análise estatística foi realizada utilizando os programas Sigma Stat (Jandel Scientific) versão 1.0, Prisma 4,0 e Microsoft Excel. Os níveis de significância dos testes foram fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha = 0,05$).

A comparação entre dois grupos de dados foi feita pelo teste de Mann Whitney e para três grupos ou mais, empregou-se a análise de variância de Kruskal-Wallis. A verificação das diferenças entre os grupos foi

avaliada pelo método de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls ou pelo método de Dunn, conforme apropriado. Para verificar a existência de associação entre os resultados do teste e os dados epidemiológicos foi empregado o coeficiente de Spearman, para os índices de reatividade (IR) e de Pearson, para os índices de avidéz (IA). O grau de associação da relação linear entre os métodos de cálculo de IA, dois a dois, e entre os valores de IA e os dados epidemiológicos, foi verificado pela regressão linear e coeficiente de correlação de Pearson. Para a comparação entre proporções empregaram-se os testes exato de Fisher ou χ^2 , conforme indicado.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO TESTE ELISA

Não houve diferença na reatividade dos soros padrão positivos e negativos pelo teste ELISA para a pesquisa de anticorpos IgG anti-PvMSP1₁₉ comparando-se a técnica descrita por Rodrigues et al., 2003 (protocolo A) com a padronizada no Laboratório (protocolo B), conforme se observa na **tabela 2**. Em ambos os protocolos, os controles da reação em que colocaram todos os reagentes exceto as amostras, apresentaram absorbâncias menores que 0,01. O melhor conjugado foi o A0170 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA), na diluição de 1/20.000.

Tabela 2. Absorbância média dos soros padrão positivo e negativo, obtidas no teste ELISA para a pesquisa de anticorpos IgG anti-PvMSP1₁₉, empregando os protocolos A e B.

Soros padrão	Protocolo A				Protocolo B			
	C1 1/15000	C1 1/20000	C2 1/5000	C2 1/10000	C1 1/15000	C1 1/20000	C2 1/5000	C2 1/10000
Positivo	0,920	0,868	0,301	0,161	1,050	0,813	0,139	0,133
Negativo 1	0,035	0,030	0,005	0,019	0,020	0,018	0,012	0,064
Negativo 2	0,000	0,001	0,000	0,000	0,009	0,006	0,006	0,007

C1 = conjugado Sigma A0170, C2 = conjugado Sigma A6029. Protocolo A = segundo Rodrigues et al., 2003. Protocolo B = padronizado no Laboratório.

2. ELISA IgG ANTI-*PvMSP1*₁₉

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram feitos em placas de poliestireno (“High Binding”, Costar 3590), sensibilizadas com 4 µg/mL do antígeno *PvMSP1*₁₉ (50 µL/cavidade) em tampão carbonato 0,05M (pH 9,6), por 2 horas a 37°C e *overnight* a 4°C. Após a sensibilização e o descarte do líquido excedente, as placas foram lavadas uma vez com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw) e bloqueadas com 200 µL de leite desnatado a 5% em PBS (PBS-Leite) por poço e incubadas por 2 horas a 37°C. Em seguida, 50 µL das diluições dos soros em PBS-Leite, na proporção de 1/100 foram adicionadas em duplicata às placas e incubadas por 30 minutos a 37°C. O excesso do líquido foi descartado e os orifícios foram lavados com PBS-Tw por três vezes. A seguir, foram adicionados 50 µL do conjugado específico anti-IgG (Sigma A0170) diluído na proporção de 1/20.000 em PBS-Leite por 30 minutos a 37°C. Após o término dessa incubação, foram realizadas mais três lavagens com PBS-Tw, como descrito anteriormente e a reação foi revelada adicionando a cada cavidade 100 µL da solução cromógena, contendo: OPD 1mg/mL, diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 e 5 µL de H₂O₂. Após incubação de 30 minutos a 37°C, a reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 2N, procedendo-se à leitura em leitor de placa de ELISA (Titertek Multiskan MCC340), a 492 nm.

3. DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE REATIVIDADE UTILIZANDO A CURVA ROC

Na curva ROC das absorbâncias de IgG anti-PvMSP1₁₉, o eixo das ordenadas representa a sensibilidade (S) e o eixo da abscissa os falso-positivos (1-E). As áreas sob a curva ROC foram de 99,40% e 99,73%, respectivamente, quando se incluíram as amostras de outras patologias ou não, no grupo controle. As **figuras 8 e 9** apresentam as curvas ROC e respectivos gráficos de frequência das absorbâncias das amostras de soros empregadas na sua construção.

As **tabelas 3 e 4** apresentam os valores dos limiares de reatividade em absorbâncias, obtidos pelas curvas ROC das **figuras 8 e 9** que foram 0,1 e 0,07, respectivamente. Neste estudo, optou-se pelo LR = 0,1.

Figura 8. (a) Curva ROC das absorbâncias de IgG anti-*PvMSP1₁₉* de 160 amostras de soro de pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax*, 125 indivíduos “saúdáveis” e 77 de outras patologias. **(b)** Distribuição das frequências das absorbâncias de infectados e não infectados, no grupo de indivíduos da **tabela 3**.

Figura 9. (a) Curva ROC das absorbâncias de IgG anti-*PvMSP1*₁₉ de 160 amostras de soro de pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax* e 125 indivíduos saudáveis. **(b)** Distribuição das frequências das absorbâncias de infectados e não infectados, no grupo de indivíduos da **tabela 4**.

Tabela 3. Variações de sensibilidade, especificidade e índice de Youden, do teste ELISA IgG anti-*PvMSP1*₁₉, definidos pelos pontos de corte (limiar de reatividade) da curva ROC.

LR	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Índice de Youden
0,05	97,50 (95,08-99,92)	92,57 (88,96-96,19)	90,07
0,06	96,25 (93,31-99,19)	95,54 (92,70-98,39)	91,76
0,07	95,63 (92,46-98,79)	97,03 (94,69-99,37)	92,66
0,08	95,63 (92,46-98,79)	98,02 (96,10-99,94)	93,65
0,09	95,00 (91,62-98,38)	98,51 (96,85-100,00)	93,51
0,10	95,00 (91,62-98,38)	99,50 (98,54-100,00)	94,50
0,11	94,38 (90,80-97,95)	99,50 (98,54-100,00)	93,88
0,12	94,38 (90,80-97,95)	99,50 (98,54-100,00)	93,88
0,13	93,75 (90,00-97,50)	99,50 (98,54-100,00)	93,25

Amostras empregadas: 160 soros de pacientes com gota positiva para *P. vivax*, 100 de doadores de banco de sangue, 25 de funcionários do laboratório e 77 pacientes com outras patologias.

Tabela 4. Variações de sensibilidade, especificidade e índice de Youden, do teste ELISA IgG anti-*PvMSP1*₁₉, definidos pelos pontos de corte (limiar de reatividade) da curva ROC.

LR	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Índice de Youden
0,05	97,50 (95,08-99,92)	97,60 (94,92-100,00)	95,10
0,06	96,25 (93,31-99,19)	99,20 (97,64-100,00)	95,45
0,07	95,63 (92,46-98,79)	100,00 (99,91-100,00)	95,63
0,08	95,63 (92,46-98,79)	100,00 (99,91-100,00)	95,63
0,09	95,00 (91,62-98,38)	100,00 (99,91-100,00)	95,00
0,10	95,00 (91,62-98,38)	100,00 (99,91-100,00)	95,00

Amostras empregadas: 160 soros de pacientes com gota positiva para *P. vivax*, 100 de doadores de banco de sangue e 25 de funcionários do laboratório.

4. AVALIAÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS – ÍNDICE DE REATIVIDADE

4.1. PACIENTES COM MALÁRIA POR *P. VIVAX*

A **figura 10** mostra a distribuição dos índices de reatividade (IR) de IgG anti-*PvMSP1*₁₉ em amostras de soro de pacientes com malária, outras doenças e controle. A análise de variância de Kruskal-Wallis mostrou haver diferenças entre os IR dos grupos estudados, $p < 0,0001$. As amostras controle utilizadas foram 77 de pacientes com outras patologias, 100 de doadores de banco de sangue e 25 de funcionários do laboratório. A mediana do grupo de outras doenças foi 0,25 e a do grupo banco de sangue junto com funcionários do laboratório foi de 0,01, havendo diferença significativa entre elas, $p < 0,0001$. Entre os pacientes com malária *vivax*, cinco com primo infecção e três que haviam tido episódios anteriores de malária, apresentaram $IR < 1,0$. Dos pacientes com primo infecção por *P. falciparum*, dois apresentaram $IR \geq 1,0$. Avaliando-se os 122 pacientes com primo infecção por *P. vivax* (Med = 8,18) e os 38 que haviam tido malárias anteriores (Med = 14,44), observou-se haver diferença significativa entre as medianas dos IR, $p = 0,0196$. Comparando-se os IR dos pacientes com outras patologias e dos indivíduos controle, observou-se que os IR foram significativamente mais elevados nas amostras de Fator Reumatóide positivo, $p < 0,001$ (**figura 10**).

Figura 10. Distribuição dos índices de reatividade de IgG anti-*PvMSP1*₁₉ em: **(a)** 125 amostras controle negativo, 77 de outras doenças, 38 gota espessa positiva para *P. vivax*, 122 primo infectados por *P. vivax* e 24 primo infectados por *P. falciparum*. **(b)** 100 amostras de doadores de banco de sangue (BS), 25 de funcionários do laboratório (LAB), 10 reativas para fator antinúcleo (FAN), sete para sífilis (SÍF), seis para toxoplasmose (TOXO), 12 para mononucleose (MONO), seis para Doença de Chagas (CHAG), cinco para Leishmaniose Mucocutânea (LMC), cinco para Leishmaniose Cutânea (LC) e 26 para Fator Reumatóide (FR).

A **figura 11** mostra os valores dos IR de pacientes com malária. Entre as amostras dos pacientes com primo infecção, as de Belém (Med = 14,33) apresentaram medianas significativamente superiores às de Igarapé-Açu (Med = 6,41) e de pacientes atendidos na SUCEN (Med = 4,65), $p < 0,0001$. A reatividade das amostras dos pacientes com primo infecção por *P. falciparum* (Med = 0,28) foi menor que nos demais grupos de infectados por *P. vivax*, $p < 0,0001$. Entre os pacientes com gota positiva que haviam apresentado episódios de malária anteriores, a análise de variância mostrou não haver diferenças entre os IR dos grupos estudados, $p = 0,6931$. Os valores das medianas foram 14,78 para os pacientes de Igarapé-Açu, 6,57 para os de Alta Floresta, 14,85 para os de Belém e 15,60 para os pacientes da SUCEN. A reatividade das amostras dos pacientes com gota espessa positiva para *P. falciparum* que haviam apresentado episódios anteriores de malária (Med = 0,61) foi menor que nos demais grupos de infectados por *P. vivax*, $p < 0,05$, exceto o grupo da SUCEN, $p = 0,1143$. Não houve diferença na reatividade das amostras de pacientes com parasitemia por *P. falciparum*, quer com primo infecção ou não, $p = 0,2506$.

Figura 11. Distribuição dos índices de reatividade de IgG anti-PvMSP1₁₉ em 17 amostras com gota espessa positiva para *P. vivax* de Belém, quatro de Igarapé-Açu, 13 de Alta Floresta, quatro da SUCEN, quatro com gota espessa positiva para *P. falciparum*, 33 com primo infecção por *P. vivax* de Belém, 21 da SUCEN, 67 de Igarapé-Açu, um de Alta Floresta e 24 com primo infecção por *P. falciparum*.

A **tabela 5** apresenta um resumo dos resultados obtidos nos grupos de pacientes estudados. Considerando-se a positividade dos diferentes grupos com malária *vivax*, observou-se não haver diferença entre os pacientes com primo infecção e os que haviam tido malárias anteriores, $p = 0,6090$. Entre os com primo infecção, a positividade foi menor nas amostras dos pacientes atendidos na SUCEN, $p = 0,0006$. Nas amostras dos pacientes que já haviam tido outras malárias, não se observou diferença na positividade, $p = 0,5625$. Comparando-se os pacientes com malária *vivax* e *falciparum*, observou-se que, entre os pacientes com primo infecção, a

positividade foi significativamente menor nos de malária *falciparum*, $p < 0,0001$. Entre os pacientes que haviam tido episódios anteriores, a positividade foi significativamente menor no grupo de malária *falciparum*, $p < 0,05$, excetuando-se o grupo de pacientes da SUCEN, $p = 0,1429$. Como no caso dos IR, não houve diferença na positividade das amostras de pacientes com parasitemia por *P. falciparum*, quer com primo infecção ou não, $p = 1,000$.

Tabela 5. Porcentagens de positividade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) e medianas dos índices de reatividade (IR) de IgG anti-PvMSP1₁₉, nos grupos de pacientes com malária.

Grupo	n	% Positividade	IC 95%	IR Mediana
Gota-Pv-B	17	94,12	71,31–99,85	14,85
Gota-Pv-IA	4	100,00	39,76–100,00	14,78
Gota-Pv-AF	13	92,31	63,97–99,81	6,57
Gota-Pv-SU	4	75,00	19,41–99,37	15,60
Total Gota-Pv	38	92,11	78,62–98,34	14,44
Primo-Pv-B	33	96,97	84,24–99,92	14,33
Primo-Pv-IA	67	100,00	93,45–100,00	6,41
Primo-Pv-SU	21	80,95	58,09–94,55	4,65
Primo-Pv-AF	1	nc	nc	15,00
Total Primo-Pv	122	95,90	92,07–99,73	8,18
Gota-Pf	4	0,00	0,00–60,41	0,61
Primo-Pf	24	8,33	1,03–7,00	0,28

Gota-Pv – pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax* que apresentaram episódios anteriores de malária. Primo-Pv – pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax* com primo infecção. Gota-Pf – pacientes com gota espessa positiva para *P. falciparum* que apresentaram episódios anteriores de malária. Primo-Pf – pacientes com gota espessa positiva para *P. falciparum* com primo infecção. B = Belém, IA = Igarapé-Açu, AF = Alta Floresta, SU = SUCEN.
nc – não calculado.

4.2. ACOMPANHAMENTO PRÉ E PÓS-TERAPÊUTICO DE PACIENTES COM MALÁRIA

A **figura 12** mostra a evolução dos níveis de anticorpos anti-*PvMSP1₁₉* nos pacientes acompanhados nos períodos pré e pós-terapêutico na SUCEN. Os pacientes de número 4, 5, 11 e 12 já haviam tido episódios anteriores de malária (Med no T0 = 15,60), os demais eram primo infectados (Med no T0 = 3,13).

Figura 12. Evolução dos níveis de anticorpos IgG anti-*PvMSP1₁₉* nos 13 pacientes com malária *vivax*, acompanhados na SUCEN, nos períodos pré (T0) e pós-tratamento (T1 = 15 dias, T2 = 1 mês, T3 = 6 meses).

Não foi possível realizar análise dos dados de um modo global, pois apenas dois pacientes comparecem às quatro coletas. Entretanto, observou-se uma tendência de IR máximo após 15 dias do início do tratamento, época em que os seis pacientes estudados apresentavam anticorpos detectáveis no soro ($IR > 1,0$). Os pacientes que apresentaram $IR > 14,0$ no T0 haviam tido episódios de malária anteriores.

4.3. MORADORES DE ALTA FLORESTA, MT

Analisando-se os resultados das amostras dos moradores de Alta Floresta, de acordo com a região onde residiam, observou-se que os indivíduos da R4065, que é a região dos garimpos, apresentaram níveis de anticorpos e porcentagem de positividade mais elevados que os das demais regiões, $p < 0,001$. Os moradores da região R4063, situada a oeste do núcleo urbano, tiveram níveis de anticorpos e porcentagem de positividade mais baixos que os demais, $p < 0,0001$. A **tabela 6** apresenta dados de positividade e de medianas das amostras de soro com $IR \geq 1,0$ dos moradores dessas regiões.

Tabela 6. Porcentagens de positividade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) e medianas dos índices de reatividade (IR) de IgG anti-*PvMSP1*₁₉, das amostras dos moradores de Alta Floresta, conforme a região da residência.

Região	n	% Positividade	IC 95%	IR Mediana
R4061	233	32,19	26,19-38,19	3,21
R4062	198	18,69	13,26-24,12	2,75
R4063	203	9,36	5,35-13,57	3,68
R4064	211	20,38	14,94-25,81	3,92
R4065	229	70,74	64,85-76,64	2,78
Total	1.074	31,29	28,51-34,06	3,06

IR Mediana – mediana dos índices de reatividade das amostras reagentes pelo teste ELISA (IR $\geq 1,00$).

As amostras dos moradores de Alta Floresta também foram avaliadas, de acordo com a coleta, no total e em cada uma das cinco regiões da área rural (**figura 13**). Nas regiões R4061 e R4064 não se observou diferença entre as medianas dos IR às três coletas, $p > 0,05$. Nas demais regiões, verificaram-se aumentos significantes dos IR à terceira em relação à primeira coleta, $p < 0,05$. Na R4065, também houve aumento da primeira para a segunda coleta, $p < 0,05$.

Figura 13. Distribuição dos índices de reatividade de IgG anti-PvMSP1₁₉ nas diferentes regiões de Alta Floresta, divididas pelo número da coleta (C).
(a) R4061 (n=233), **(b)** R4062 (n=198), **(c)** R4063 (n=203), **(d)** R4064 (n=211), **(e)** R4065 (n=229), **(f)** todas as regiões (n=1074).

Em relação à porcentagem de positividade, não houve diferença entre as três coletas nas regiões R4061 e R4063, $p > 0,05$. Na região R4062 houve aumento à terceira coleta em relação à primeira e à segunda, $p < 0,05$. Na região R4064 houve aumento à segunda coleta em relação à primeira, $p > 0,05$. Na região R4065, houve aumento da segunda e da terceira coletas em relação à primeira, $p < 0,05$. A **tabela 7** mostra os dados de positividade e de medianas das amostras com $IR \geq 1,0$ nas três coletas.

Tabela 7. Porcentagens de positividade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) e medianas dos índices de reatividade (IR) de IgG anti-*PvMSP1*₁₉, das amostras dos moradores de Alta Floresta, conforme a região da residência, nas três coletas.

Região	Coleta	n	% Positividade	IC 95%	IR Mediana
R4061	1 ^a	60	40,00	27,60-52,40	3,02
	2 ^a	81	27,16	17,47-36,85	3,68
	3 ^a	92	31,52	22,03-41,02	3,85
R4062	1 ^a	64	10,94	3,29-18,58	2,58
	2 ^a	64	14,06	5,55-22,58	3,79
	3 ^a	70	30,00	19,27-40,74	2,63
R4063	1 ^a	54	11,11	2,73-19,49	3,14
	2 ^a	74	4,05	0,00-8,55	10,28
	3 ^a	75	13,33	5,64-21,03	3,29
R4064	1 ^a	61	9,84	2,36-17,31	2,39
	2 ^a	70	30,00	19,27-40,74	5,29
	3 ^a	80	20,00	11,24-28,77	3,15
R4065	1 ^a	59	33,90	21,82-45,98	1,94
	2 ^a	92	83,70	76,15-91,24	2,78
	3 ^a	78	83,33	75,06-91,60	3,05
Total	1 ^a	298	21,14	16,51-25,78	2,42
	2 ^a	381	34,65	29,87-39,42	3,38
	3 ^a	395	35,70	30,97-40,42	3,20

IR Mediana – mediana dos índices de reatividade das amostras reagentes pelo teste ELISA ($IR \geq 1,00$).

A **figura 14** mostra a distribuição dos IR pelo tempo decorrido desde a última malária, nos moradores de Alta Floresta. É importante salientar que esses dados referem-se à declaração feita pelos próprios moradores, exceto os dados de malária atual que foram diagnosticados pela gota espessa, no momento da coleta.

Figura 14. Distribuição dos índices de reatividade de IgG anti-PvMSP1₁₉ em 14 pacientes com malária atual por *P. vivax*, 62 pacientes que tiveram malária até 1 mês antes da coleta, 85 coletadas depois de 1 mês e antes de 6 meses da última malária, 193 coletadas depois de 6 meses e antes de 2 anos, 199 coletadas depois de 2 anos e 501 amostras de pacientes que nunca tiveram malária. M = mês, A = ano.

Observaram-se níveis de anticorpos mais elevados entre os pacientes com malária *P.vivax* no momento da coleta (atual) e os que haviam tido malária há menos de 1 mês ($\leq 1M$), em relação aos que haviam

tido malária há mais de 6 meses, $p < 0,001$. Os indivíduos com mais de 1 mês e menos de 6 meses ($> 1M \leq 6M$) e com mais de 6 meses e menos de 2 anos de última malária ($> 6M \leq 2A$) apresentaram níveis mais elevados que os que haviam tido malária há mais de 2 anos ($\geq 2A$), $p < 0,05$. Os moradores que relataram nunca ter tido malária (nenhuma malária) apresentaram níveis de anticorpos significativamente mais baixos que os demais grupos, $p < 0,0001$. Resultados semelhantes foram obtidos em relação à positividade nos diferentes tempos (**tabela 8**).

Tabela 8. Porcentagens de positividade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) e medianas dos índices de reatividade (IR) de IgG anti-*PvMSP1*₁₉, das amostras dos moradores de Alta Floresta, conforme o tempo decorrido desde o último episódio de malária (TUM).

TUM	n	% Positividade	IC 95%	IR Mediana
Atual	14	92,86	66,13-99,82	9,38
< 1 M	62	80,65	68,63-89,58	6,44
> 1 M < 6 M	85	65,88	54,80-75,82	1,89
> 6 M < 2 A	193	50,77	43,72-57,83	1,01
> 2 A	199	34,67	28,06-41,29	0,53
Não teve malária	501	9,58	7,00-12,16	0,22

M = meses, A = anos.

A análise dos indivíduos não-infectados mostrou haver uma associação negativa dos resultados do ELISA *PvMSP1₁₉* com o tempo decorrido desde o último episódio de malária ($p = 0,00$) e associação positiva com o número de malárias anteriores ($p = 0,00$). A **tabela 9** detalha os resultados dos testes de associação realizados.

Tabela 9. Associação entre o resultado do ELISA *PvMSP1₁₉* e os dados epidemiológicos (tempo decorrido após o último episódio de malária e número de episódios de malária anteriores) em moradores de Alta Floresta com gota espessa negativa.

Tempo	Parâmetro	Espécie da última malária					
		<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>		<i>P. falciparum</i> ou <i>P. vivax</i>	
		r	p	r	p	r	p
< 1 M	TUM	-0,23	0,45	-0,40	0,007 *	-0,36	0,005 *
> 1 M < 6 M		-0,31	0,23	0,05	0,73	-0,11	0,32
> 6 M < 2 A		-0,12	0,32	0,03	0,79	-0,03	0,63
> 2 A		-0,06	0,70	-0,29	0,007 *	-0,21	0,003 *
Total		-0,27	0,00 *	-0,45	0,00 *	-0,37	0,00 *
< 1 M	NM	0,47	0,10	0,16	0,30	0,12	0,36
> 1 M < 6 M		0,30	0,24	0,10	0,46	0,23	0,03 *
> 6 M < 2 A		0,21	0,08	0,34	0,002 *	0,25	0,00 *
> 2 A		0,32	0,02 *	0,16	0,15	0,23	0,001 *
Total		0,32	0,00 *	0,25	0,00 *	0,27	0,00 *

TUM = tempo decorrido desde o último episódio de malária, NM = número de episódios de malária anteriores à coleta.

* $p < 0.05$ – Há associação entre os parâmetros, M = meses, A = anos.

r – coeficiente de correlação de Spearman.

5. ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO ÍNDICE DE AVIDEZ (IA)

O índice de avides (IA) foi calculado apenas para as amostras reagentes ($IR \geq 1,0$).

5.1. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE CÁLCULO DO ÍNDICE DE AVIDEZ (IA)

Comparando-se os três métodos para o cálculo do IA, observou-se que valores mais elevados de IA foram obtidos com o método que calcula o IA à primeira diluição, com/sem uréia (IA 1ª DIL), nos três grupos de amostras estudadas, $p < 0,0001$. A **tabela 10** e a **figura 15** resumem os resultados obtidos na comparação entre os métodos, nos diferentes grupos avaliados.

O modelo que calcula o IA ao ponto do LR (IA 0,1) apresentou resultados inconsistentes, IA acima de 1,00, em nove das amostras ensaiadas, que por esse motivo foram excluídas da análise da **tabela 10**. Os três métodos de cálculo de IA empregados mostraram diferenças significantes entre a mediana dos IA dos pacientes com primo infecção e dos que haviam apresentado episódios de malária anteriores, $p < 0,0001$.

Tabela 10. Análise comparativa das medianas dos índices de avidéz (IA) de IgG anti-*Pv*MSP1₁₉, obtidos pelos três métodos de cálculo, nos grupos de pacientes estudados.

Grupo	n	Método de cálculo do IA			p
		IA 0,5 U	IA 0,1	IA 1ª DIL	
Primo-<i>Pv</i>	114	0,05	0,02	0,12	< 0,0001
Gota-<i>Pv</i>	33	0,33	0,28	0,55	< 0,001
AF ≥ 6 M	72	0,42	0,28	0,47	< 0,0001
<hr/>					
Primo-<i>Pv</i> x Gota-<i>Pv</i>		IA 0,5 U	IA 0,1	IA 1ª DIL	
<hr/>					
p		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	

Gota-*Pv* – pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax* que apresentaram episódios anteriores de malária. Primo-*Pv* – pacientes com primo infecção por *P. vivax*. AF ≥ 6 M – moradores de Alta Floresta que haviam tido o último episódio de malária até 6 meses antes da coleta.

IA 0,5 U – cálculo do IA ao ponto de 50% da absorbância máxima com uréia.

IA 0,1 – cálculo do IA ao ponto Limiar de Reatividade (0,1).

IA 1ª DIL – cálculo do IA à primeira diluição.

Figura 15. Gráficos de regressão linear dos índices de avides (IA) de IgG anti-*PvMSP1*₁₉, calculados pelos métodos estudados, relacionados dois a dois, em amostras de moradores de Alta Floresta, que haviam apresentado o último episódio de malária há, no máximo 6 meses da coleta **(a)**, **(b)**, **(c)** e em pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax* no momento da coleta **(d)**, **(e)**, **(f)**.

IA 0,5U – cálculo do IA ao ponto de 50% da absorbância máxima com uréia.

IA 0,1 – cálculo do IA ao ponto do limiar de reatividade (0,1).

IA 1ª DIL – cálculo do IA à primeira diluição.

Número de amostras testadas: n=72 **(a)**, **(b)**; n=76 **(c)**; n=147 **(d)**, **(e)**; n=152 **(f)**.

r = coeficiente de correlação de Pearson.

A **figura 16** mostra a relação entre os valores de IA, pelos três métodos, e dados epidemiológicos dos moradores de Alta Floresta que haviam tido episódios de malária há, no máximo, 6 meses da coleta das amostras. Observa-se que os coeficientes de correlação (r) foram mais elevados no método IA 0,5U (cálculo do IA ao ponto de 50% da absorbância máxima com uréia).

Figura 16. Gráficos de regressão linear entre os índices de avides (IA) de IgG anti-*PvMSP1*₁₉, e dados epidemiológicos: TUM – tempo decorrido desde o último episódio de malária (a), (b), (c). NM – número de episódios de malárias anteriores (d), (e), (f).

Os IA foram calculados pelos métodos estudados, em amostras de moradores de Alta Floresta, que haviam apresentado o último episódio de malária há, no máximo 6 meses da coleta e em pacientes com malária.

IA 0,5U – cálculo do IA ao ponto de 50% da absorbância máxima com uréia.

IA 0,1 – cálculo do IA ao ponto do limiar de reatividade (0,1).

IA 1ª DIL – cálculo do IA à primeira diluição.

Número de amostras testadas: n=76 (a), (c), (d), (f); n=76 (b), (e).

r = coeficiente de correlação de Pearson.

Com base nos resultados expostos nos parágrafos acima, optou-se pelo método IA 0,5U (cálculo do IA ao ponto de 50% da absorbância máxima com uréia) e, portanto, as análises seguintes foram realizadas apenas com o método de cálculo de IA 0,5U.

5.2. GRUPOS DE PACIENTES COM MALÁRIA POR *P. VIVAX*

A **figura 17** mostra a distribuição dos IA entre os grupos de pacientes com malária. Considerando-se os pacientes com gota espessa positiva que haviam apresentado episódios de malária anteriores, as amostras da SUCEN (Med = 0,020) apresentaram medianas significativamente menores às de Alta Floresta (Med = 0,495), $p = 0,0126$. Os valores das medianas foram 0,325 para as amostras de Belém e 0,270 para as de Igarapé-Açu. Considerando-se os pacientes com primo infecção, não se observaram diferenças entre os IA dos grupos, $p = 0,2922$. Os valores das medianas dos IA foram 0,045 para os pacientes de Belém, 0,040 para os de Igarapé-Açu e 0,08 para os da SUCEN. Entre as amostras de Alta Floresta havia apenas um morador com primo infecção por *P. vivax*, cujo IA foi 0,030. Avaliando-se os 117 pacientes com primo infecção (Med = 0,050) e os 35 que haviam tido malárias anteriores (Med = 0,330), observou-se haver diferença significativa entre as medianas, $p < 0,0001$.

Figura 17. Distribuição dos índices de avidéz de IgG anti-*PvMSP1₁₉* em 16 amostras gota espessa positiva para *P. vivax* de Belém, quatro de Igarapé-Açu, 12 de Alta Floresta, três da SUCEN, 32 com primo infecção por *P. vivax* de Belém, 66 de Igarapé-Açu, 18 da SUCEN e uma de Alta Floresta.

5.3. ACOMPANHAMENTO PRÉ E PÓS-TERAPÊUTICO DE PACIENTES COM MALÁRIA

Os resultados da avidéz de IgG anti-*PvMSP1₁₉* no grupo de pacientes com acompanhamento pré e pós-terapêutico encontram-se na **figura 18**. Como aconteceu com os IR, não foi possível realizar análise dos dados de um modo geral, pois apenas dois pacientes comparecem às quatro coletas e, além disso, não é possível calcular o IA das amostras negativas, o que diminui a casuística ainda mais.

Figura 18. Evolução dos índices de avididade de IgG anti-PvMSP1₁₉ em 11 pacientes, com malária vivax, acompanhados na SUCEN, nos períodos pré (T0) e pós-tratamento (T1 = 15 dias, T2 = 1 mês, T3 = 6 meses).

5.4. MORADORES DE ALTA FLORESTA, MT

Analisando-se os resultados das amostras dos moradores de Alta Floresta, de acordo com a região onde residiam, observou-se que os indivíduos da região R4061 (Med = 0,500) apresentaram índices de avididade mais elevados que os das regiões R4062 (Med = 0,330) e R4064 (Med = 0,200), $p < 0,05$. As amostras da região R4062 tiveram IA menores que as das R4061 e R4065, $p < 0,05$. As amostras dos moradores da região R4063, que tiveram níveis mais baixos de anticorpos, apresentaram altos IA (Med = 0,560), superiores aos da região R4064, $p < 0,05$. Na região R4065, observaram-se IA superiores que nas R4062 e R4064, $p < 0,05$.

Considerando-se as três coletas realizadas, verificaram-se que as medianas dos IA foram respectivamente 0,400, 0,410 e 0,450, na primeira (1ª), segunda (2ª) e terceira (3ª) coletas, não havendo diferença significativa entre elas, $p = 0,3303$ (figura 19).

Figura 19. Distribuição dos índices de avidéz de IgG anti-*PvMSP1₁₉* nas diferentes amostras de Alta Floresta. **(a)** regiões de Alta Floresta – R4061 (n=24), R4062 (n=12), R4063 (n=5), R4064 (n=19), R4065 (n=31). **(b)** nas coletas – 1ª (n=16), 2ª (n=45), 3ª (n=30).

A **figura 20** mostra a distribuição dos IA pelo tempo decorrido desde a última malária, nos moradores de Alta Floresta. A análise de variância mostrou não haver diferença entre os IA dos três grupos avaliados: malária atual (Med = 0,450), malária há menos de 1 mês da coleta (Med = 0,400) e malária com mais de 1 mês e menos de 6 meses da coleta (Med = 0,450), $p = 0,3123$.

Em 76 amostras de moradores de Alta Floresta não-infectados, observou-se associação positiva dos valores de IA com o número de episódios de malárias anteriores ($r = 0,528$, $p < 0,0001$) e com o tempo decorrido desde o último episódio ($r = 0,343$, $p = 0,0024$).

Em nenhum dos grupos estudados observou-se correlação entre valores de IA e de IR.

Figura 20. Distribuição dos índices de avididade de IgG anti-*PvMSP1*₁₉ em 13 pacientes com malária atual, 35 pacientes que tiveram malária até 1 mês antes da coleta e 41 coletados depois de 1 mês e antes de 6 meses da última malária.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A porção de 19 kDa da região C-terminal da proteína 1 de superfície de merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP1₁₉) tem sido considerada uma das candidatas mais promissoras para o desenvolvimento de uma vacina contra as formas eritrocitárias da malária (Arévalo-Herrera e Herrera, 2001; Cunha et al., 2001; Soares e Rodrigues, 2002; Rosa et al., 2006). Deste modo, o estudo do reconhecimento do recombinante por anticorpos IgG de soros de moradores (infectados ou não) de diferentes localidades e com graus de endemicidade distintos pode fornecer subsídios para um melhor conhecimento da resposta imune a infecções naturais e à vacinação.

Para a padronização do teste ELISA para a pesquisa de anticorpos IgG anti-PvMSP1₁₉, tomou-se como base a técnica descrita por Rodrigues et al., 2003, introduzindo-se algumas modificações. Deste modo, foi reduzido o tempo total de reação para 90 minutos (30 minutos para cada etapa da reação), que é menor do que duração registrada na literatura (Rodrigues et al., 2003; Lim et al., 2004).

A construção de curvas ROC, para a determinação do limiar de reatividade do teste, permitiu a avaliação de diferentes pontos de corte, possibilitando o estabelecimento do limiar de reatividade (LR) de uma maneira mais precisa. Se o grupo de outras patologias não relacionadas à

malária fosse excluído do cálculo do LR, os parâmetros de sensibilidade e especificidade seriam mais elevados (índice de Youden = 95,63, para LR = 0,07), porém com esse valor de LR, cinco amostras de pacientes com fator reumatóide e uma com fator anti-núcleo teriam $IR \geq 1,0$. Deste modo, foram levados em consideração os resultados que incluem o grupo de outras patologias não relacionadas à malária (**tabela 3**), sendo escolhido o LR de 0,10, que forneceu sensibilidade de 95,00%, especificidade de 99,50% e índice de Youden de 94,50. Neste caso, a área sob a curva ROC foi de 99,40% ou 0,994 (**figura 8-a**), superior a 0,9, considerado desempenho excelente para um ensaio (Greiner et al., 2000; Martinez et al., 2003).

A análise das distribuições das porcentagens de não-infectados e infectados, em relação aos valores das absorbâncias obtidas no teste ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-*PvMSP1*₁₉, apresentadas nas **figuras 8-b e 9-b**, mostra uma sobreposição das curvas, devido a oito amostras de pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax*, que não reagiram no teste. Dessas amostras, cinco eram de pacientes que apresentavam seu primeiro episódio de malária, e três de pacientes que haviam apresentado episódios anteriores de malária. Entre esses três pacientes, uma era de Belém e havia tido um episódio de malária 10 anos antes, outro havia sido atendido na SUCEN e também havia tido um único episódio de malária 2 anos antes e o último era morador de Alta Floresta e tinha tido sua segunda malária 5 anos antes da coleta das amostras. Entre os pacientes com primo infecção, quatro haviam sido atendidos na SUCEN e apresentavam sintomas há, no máximo 5 dias do diagnóstico e coleta das amostras.

A sensibilidade de 95,90% obtida em pacientes com primo-infecção por *P. vivax* está de acordo com resultados obtidos por Rodrigues et al., 2003, que encontraram sensibilidade de 90,9% em 111 pacientes primo infectados. Nos pacientes com parasitemia por *P. vivax*, que haviam tido episódios de malária anteriores à coleta, obteve-se uma sensibilidade menor, 92,11%. Vale a pena citar que os três pacientes que possuíam níveis de anticorpos abaixo do LR do teste, haviam apresentado os episódios anteriores de malária há 2 anos ou mais, como citado anteriormente, o que pode justificar o seu comportamento como se fossem primo-infectados. Embora não se tenha observado diferença na sensibilidade dos grupos com primo infecção e malárias anteriores ($p = 0,6090$), verificou-se que os níveis de anticorpos IgG específicos para *PvMSP1₁₉*, foram significativamente superiores no grupo que havia apresentado episódios anteriores de malária ($p = 0,0196$), embora já estivessem elevados nos pacientes com primo infecção. Estas constatações corroboram com a idéia de que um único episódio de malária desencadeia resposta de anticorpos específicos na grande maioria dos indivíduos (Rodrigues et al., 2003).

Analizando os níveis de anticorpos IgG específicos para *PvMSP1₁₉* nas amostras dos pacientes com primo infecção, verificou-se que os IR foram mais elevados no grupo de Belém, localidade com menor índice de exposição à malária, à época da coleta das amostras (1997), como demonstrado pelo IPA de 2,34/1.000 habitantes (baixo risco). Entre os pacientes que haviam apresentado episódios de malária anteriores, no grupo de Alta Floresta, observou-se o menor valor da mediana dos IR. Este

município apresentava em 1995/1996, época da coleta das amostras, IPA em torno de 70/1.000 habitantes, indicativo de alto risco (Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2005). Estes resultados são concordantes com os obtidos por Moraes et al., 2005, que encontraram altos níveis de anticorpos de IgG anti-*PvMSP1₁₉* em indivíduos com baixa exposição à malária (Belém, Cuiabá e Terra Nova do Norte), quando comparados a moradores de Apiacás, área de alta transmissão de malária.

Nas amostras de pacientes infectados por *P. falciparum*, que não haviam apresentado episódios anteriores de malária, observou-se uma positividade de 8,33%, confirmando a alta especificidade do *PvMSP1₁₉* (Rodrigues et al., 2003; Moraes et al., 2005). Este alto grau de especificidade do *MSP1₁₉* pode apresentar desvantagens no desenvolvimento da imunidade adquirida naturalmente ou por vacinação (Rodrigues, 2004), pois não se obteria contra as outras espécies de plasmódios.

Devido ao não comparecimento de alguns dos pacientes com malária por *P. vivax* nos períodos estabelecidos para o acompanhamento pela SUCEN, não foi possível realizar uma análise geral dos resultados obtidos. Entretanto, é importante ressaltar que os quatro pacientes com sorologia negativa no momento da coleta, apresentavam sintomas a, no máximo 5 dias. Esses pacientes residiam em São Paulo e haviam contraído malária em Rondônia e Amazonas. Além disso, observou-se que 15 dias após o início do tratamento, os níveis de anticorpos específicos atingiram o

valor máximo em 83,33% (5/6) dos pacientes, apresentando tendência de queda nas coletas seguintes (1 e 6 meses após o início do tratamento).

A menor positividade de anticorpos IgG específicos para *PvMSP1₁₉* observada nas amostras dos pacientes com primo infecção, atendidos na SUCEN, pode ser devida ao diagnóstico mais precoce nesses pacientes, quando comparados com os grupos de Belém e Igarapé-Açu, provavelmente porque o *switch* de IgM para IgG ainda não havia sido concluído. Rodrigues et al., 2003, empregando o mesmo antígeno, obtiveram 90% de sensibilidade para IgM em amostras não reagentes para IgG, corroborando essa hipótese.

Como era de se esperar, nas amostras dos moradores de Alta Floresta, localidade endêmica para malária na ocasião da coleta dos soros, obteve-se elevada positividade do teste, pois *P. vivax* era a espécie mais prevalente no município, com 68,4% dos casos notificados, segundo dados fornecidos pela Fundação Nacional de Saúde de Mato Grosso.

Os moradores da região dos garimpos, R4065, apresentaram níveis e positividade de anticorpos IgG específicos para *PvMSP1₁₉* mais elevados que os das demais regiões. Sabe-se que nas regiões de garimpos as condições de moradia são propícias à transmissão da malária, devido a ausência de paredes nas tendas, à proximidade da floresta e de coleções de água, entre outros fatores, facilitando o contato entre homem e vetor. Nesta região foram detectados quatro casos de malária durante as coletas, sendo um por *P. vivax* e três por *P. falciparum*, que era a espécie prevalente da

região. Este fato explica porque não houve diferença nas medianas das amostras com $IR \geq 1,0$ entre a região dos garimpos e as demais, reafirmando a alta especificidade do antígeno *PvMSP1₁₉* (Rodrigues et al., 2003; Moraes et al., 2005).

A região R4063 localiza-se a oeste do núcleo urbano de Alta Floresta, mais urbanizada e distante da mata, onde se observou baixa positividade em níveis de anticorpos IgG anti-*PvMSP1₁₉*, como era de se esperar.

As regiões R4061 e R4062 correspondem à área que se separou de Alta Floresta e atualmente faz parte do município de Carlinda. Nessas regiões, principalmente na R4061, observou-se grande quantidade de residências construídas muito perto da mata, invadindo o habitat do mosquito, o que justifica os altos índices de positividade e IR elevados encontrados.

Apesar da estabilidade da malária no município de Alta Floresta, como se observa pelos valores de IPA próximos, nos anos de 1995/1996, verificou-se aumento da positividade e das medianas dos IR de IgG anti-*MSP1₁₉* na segunda e na terceira coleta em relação à primeira, tanto no município em geral, como na região dos garimpos. Deve-se ressaltar que esse aumento no total foi devido principalmente a essa região. Na R4064, o aumento da positividade da primeira para a segunda coleta foi decorrente de um surto de malária por *P. vivax*, que havia ocorrido na região dias antes da segunda coleta. O aumento da positividade e das medianas dos IR da

primeira para a segunda coletas observado na região R4062 coincidiu com a divisão do município de Alta Floresta, passando essa área a pertencer ao novo município de Carlinda.

Como já havia sido verificado por outros autores (Soares et al., 1997, 1999b; Moraes et al., 2005), uma proporção significativa de indivíduos expostos naturalmente à malária, mas sem parasitemia, apresentaram anticorpos IgG específicos contra *PvMSP1₁₉* (51,72%), entre os que relataram ter apresentado episódios anteriores de malária (Med = 1,5 anos para o tempo decorrido desde o último episódio de malária e Med = 3 para o número de malárias anteriores). Entretanto, observaram-se níveis e positividade mais elevados nos pacientes que estavam com parasitemia no momento da coleta e os que haviam tido malária há menos de 1 mês, havendo uma diminuição significativa com o aumento do tempo decorrido desde o último episódio.

A persistência desses anticorpos ainda é uma questão que deve ser mais bem estudada. Utilizando outro recombinante produzido em bactéria, baseado no *PvMSP1₁₉* (GST-ICB10), Soares et al., 1999a, verificaram que os títulos de anticorpos diminuía de um modo relativamente rápido, após o tratamento. Contudo, alguns autores têm mostrado que anticorpos específicos contra *PvMSP1₁₉* permanecem por longo período de tempo (mais de 30 anos) após a infecção (Lim et al., 2004).

Entre os moradores que relataram não ter apresentado episódios anteriores de malária, 9,58% tinham anticorpos IgG anti-*PvMSP1₁₉*, a

maioria em níveis baixos. Tal reatividade pode ser explicada pela imprecisão dos relatos dos moradores, pela falta de diagnóstico das malárias anteriores ou pela ocorrência de casos assintomáticos da doença (Soares et al., 1999b). Em estudos realizados na ilha de Cotijuba, PA, esses autores obtiveram 50% de positividade em moradores sem história de malárias pregressas, empregando outro recombinante produzido em bactéria, baseado no *PvMSP1₁₉* (GST-ICB10).

Foi observada uma associação negativa entre a reatividade ao antígeno *PvMSP1₁₉* e o tempo decorrido desde o último episódio de malária por *P. vivax*, e associação positiva com o número de malárias anteriores. Coelho et al., 2006, empregando o dot-ELISA não encontraram associação entre o número de episódios de malária e a reatividade ao antígeno *PvMSP1₁₉*, pois esta já estava elevada nos primo infectados.

O método proposto para o cálculo da avidéz dos anticorpos IgG anti- *PvMSP1₁₉* utiliza a uréia como agente de dissociação. Um ponto crítico deste tipo de ensaio é a quantidade de anticorpo, que não pode estar em excesso, pois nessas condições, apenas uma pequena população dos anticorpos, preferencialmente os de maior avidéz, se ligarão ao antígeno, promovendo uma superestimativa dos valores dos IA e perdendo-se informação à respeito dos anticorpos de baixa avidéz. Esse artefato pode ser minimizado utilizando baixas concentrações de anticorpos, que também tem o efeito de diminuir a formação de agregados, principalmente quando se

trabalha com anticorpos policlonais e antígenos complexos (Steward e Chargelegue, 1996, Butler, 2000).

A existência de elevada correlação entre os valores de IA, obtidos pelos três métodos, relacionados dois a dois, mostrou boa concordância entre eles, quando analisados em amostras de pacientes com malária por *P.vivax* e em indivíduos que haviam tido malária há 6 meses ou menos. Porém, a análise caso a caso, revelou que o cálculo do IA ao ponto do limar de reatividade (IA 0,1) necessita ser repetido quando as diluições testadas são insuficientes para se chegar ao valor LR (Prince e Wilson, 2001), caso contrário serão obtidos valores de IA inconsistentes, acima de 1,00. O cálculo do IA à primeira diluição, que é um dos mais utilizados devido a sua praticidade, tem como principal desvantagem a grande variabilidade nos resultados dependendo da quantidade de IgG específico na amostra (Jenum et al., 1997).

O método de cálculo do IA ao ponto de 50% da absorbância máxima com uréia (IA 0,5U) forneceu resultados consistentes quando relacionado aos dados epidemiológicos dos moradores de Alta Floresta. Foi observada uma associação positiva entre IA dos anticorpos IgG dirigidos contra o recombinante *PvMSP1₁₉* e o número de malárias anteriores ($r = 0,528$). Em relação ao tempo decorrido desde o último episódio de malária, observou-se associação positiva ($r = 0,343$), pois sendo analisados somente os moradores que haviam tido malária há, no máximo, 6 meses. No estudo da reatividade de IgG estudaram-se todos os moradores. Com os outros dois

métodos de cálculo de IA, obtiveram-se graus menores de associação com os parâmetros epidemiológicos.

Pacientes com primo infecção por *P. vivax* apresentaram predomínio de anticorpos de baixa avidéz, enquanto que nos pacientes com gota espessa positiva para *P.vivax* que haviam tido episódios anteriores de malária observou-se predomínio de anticorpos de alta avidéz. Os baixos IA dos anticorpos IgG anti-PvMSP1₁₉ observados nos pacientes primo infectados por *P.vivax*, sugerem um baixo grau de proteção, mesmo na presença de elevados níveis de anticorpos observados já no início da infecção. A ocorrência de IA elevados em algumas amostras de pacientes com primo infecção deverá ser melhor avaliada, embora alguns desses resultados possam ser explicados, como descrito anteriormente, pela imprecisão dos relatos dos moradores, pela falta de diagnóstico das malárias anteriores ou pela ocorrência de casos assintomáticos da doença.

Entre os pacientes que haviam apresentado episódios de malária anteriores, nos de Alta Floresta, observou-se o maior valor da mediana dos IA, contrário do que se observou com os valores de IR, sugerindo uma maturação da afinidade dos anticorpos em decorrência da maior exposição à malária.

Como referido para os IR, não foi possível analisar o comportamento dos IA nos pacientes atendidos pela SUCEN. Nos pacientes estudados não se observou um padrão de resposta ou de evolução dos

índices, obtendo-se IA elevados em primo infectados (três amostras) e baixos em pacientes que haviam relatado malárias anteriores (duas amostras).

A análise da avidéz nas amostras com $IR \geq 1,0$ mostrou que as regiões com maior transmissão da malária, R4061 e R4065, foram as que apresentaram níveis de avidéz mais elevados, corroborando com a hipótese da maturação da afinidade. Deve-se salientar que a R4063, região com menor positividade, também apresentou elevados IA em quatro das cinco amostras avaliadas. Na R4064 observaram-se níveis de IA mais baixos do que nas demais regiões, provavelmente como consequência do surto de malária que havia ocorrido poucos dias antes da segunda coleta.

Neste estudo, não se observou diferença nos níveis de avidéz de IgG em pacientes com malária atual, de indivíduos que tiveram malária há 1 mês ou menos e de moradores que tiveram malária há mais de 1 e menos de 6 meses. Porém, quando se analisaram os moradores não-infectados, obteve-se associação positiva dos níveis de avidéz com o número de episódios de malárias anteriores e com o tempo decorrido desde o último episódio de malária, como citado anteriormente.

Devido à falha no acompanhamento dos pacientes atendidos na SUCEN, não foi possível avaliar a relação entre tempo de infecção e níveis de avidéz, como realizado por outros autores para malária (Ferreira et al., 1996), tuberculose (Arias-Bouda et al., 2003) e paracoccidiodomicose (Yoshida, 2005). Yoshida, 2005 observou aumento da avidéz no período

pós-terapêutico nos pacientes com a forma crônica multifocal. Ferreira et al., 1996, observaram aumento dos níveis de avidéz dos anticorpos após 2 meses de tratamento, em relação à fase aguda da malária. Na toxoplasmose, a avidéz de IgG anti-*T. gondii* é muito importante na diferenciação entre infecção recente e passada, principalmente em mulheres grávidas, pois a presença de anticorpos de alta avidéz excluem a possibilidade da infecção ter ocorrido nos últimos 5 meses (Prince e Wilson, 2001).

A ausência de correlação entre níveis e avidéz dos anticorpos IgG anti-*PvMSP1*₁₉ observada neste trabalho, também foi relatada por outros autores, que estudaram tétano (Gerber, 2002), tuberculose (Arias-Bouda et al., 2003), toxoplasmose (Tanyuksel et al., 2004) e paracoccidioidomicose (Yoshida, 2005).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Foi padronizado um ensaio imunoenzimático para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*PvMSP1*₁₉ em amostras de soro, obtendo-se níveis de sensibilidade e especificidade adequados para o estudo proposto.
2. Considerando-se os pacientes com malária por *P. vivax* no momento da coleta, os índices de reatividade foram significativamente mais elevados nos pacientes que haviam apresentado episódios de malária anteriores, em comparação aos primo infectados.
3. Os pacientes com malária por *P. falciparum* no momento da coleta, apresentaram níveis de anticorpos e positividade significativamente inferiores aos pacientes com malária por *P. vivax*, comprovando o alto grau de especificidade do *PvMSP1*₁₉.
4. Nos pacientes com malária por *P. vivax* no momento da coleta, observaram-se níveis mais baixos de anticorpos em residentes em áreas de alto risco de transmissão e mais elevados em moradores com menor índice de exposição à malária.
5. Nos moradores de Alta Floresta, a positividade foi mais elevada nas regiões dos garimpos e próximas à mata e mais baixa em regiões próximas ao núcleo urbano.

6. Observou-se associação negativa entre a reatividade ao antígeno PvMSP1₁₉ e o tempo decorrido desde o último episódio de malária por *P. vivax*, e associação positiva com o número de malárias anteriores.
7. O modelo proposto para o cálculo da avidéz dos anticorpos IgG anti-PvMSP1₁₉ forneceu resultados consistentes com os dados epidemiológicos dos moradores de área
8. Foi observada uma associação positiva da avidéz de IgG com o número de malárias anteriores e com o tempo decorrido desde o último episódio de malária.
9. Pacientes com primo infecção por *P. vivax* apresentaram predomínio de anticorpos de baixa avidéz, sugerindo um baixo grau de proteção, mesmo na presença de elevados níveis de anticorpos observados já no início da infecção. Nos pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax* que haviam tido episódios anteriores de malária observou-se predomínio de anticorpos de alta avidéz.
10. Nos pacientes com malária por *P. vivax* no momento da coleta, observaram-se níveis mais elevados de avidéz em residentes em áreas de alto risco de transmissão, sugerindo uma maturação da afinidade dos anticorpos em decorrência da maior exposição à malária.

11. Nos moradores de Alta Floresta, a avidéz foi mais elevada nas regiões dos garimpos e perto da mata.
12. Não foi observada correlação entre níveis e avidéz dos anticorpos IgG anti-*PvMSP1*₁₉.

ANEXOS

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I-DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL:

NOME DO PACIENTE.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº.....SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO:...../...../.....
 ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:.....
 BAIRRO:.....CIDADE:.....
 CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).
 RESPONSÁVEL LEGAL.....
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc.).....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº.....SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO:...../...../.....
 ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:.....
 BAIRRO:.....CIDADE:.....
 CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).

II- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Níveis e avidéz de anticorpos IgG específicos para a porção de 19kDa da região C-terminal da proteína-1 de superfície de merozoítos de *P.vivax* (MSP1₁₉).em grupos populacionais expostos à malária.**
2. PESQUISADOR: **Antonio Walter Ferreira**
 CARGO/FUNÇÃO: **Diretor do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**
 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRF:11.806
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: **risco mínimo**
- 4.DURAÇÃO DA PESQUISA: **24 meses**

III- REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Neste estudo pretendemos desenvolver um método para cultivar o plasmódio que causa a malária *vivax*, que é a mais comum no Brasil. Para isso, precisamos colher sangue de pacientes com malária, pacientes sem doença, pacientes com hemocromatose, e pacientes com anemias causadoras de reticulocitose. A sua colaboração nesse sentido, seria a doação de sangue, obtida por punção venosa, que pode lhe causar um leve desconforto pela picada, mas nenhum risco maior. Os resultados obtidos poderão acrescentar informações importantes no conhecimento da doença, que poderá beneficiar no futuro todas as pessoas que estão expostas à malária.

IV- ESCLARECIMENTOS SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- 1.acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.
- 2.liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
- 3.disponibilidade de assistência nos serviços de saúde, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
- 4.salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
- 5.viability de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V- INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DO RESPONSÁVEL PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI- CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO:

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,dede 2003.

 assinatura do sujeito da pesquisa
 ou responsável legal

 Antonio Walter Ferreira
 Pesquisador

Anexo II

Dados pessoais dos pacientes de Belém-PA e resultados dos métodos Gota espessa e ELISA *PvMSP1*₁₉ (IR e IA)

AMOSTRA	IDADE	SEXO	Num mal ant	ultima mal	gota	parasitemia	IR	IA 0,5U	IA CO	IA 1ª DIL
1B		F					3,91	0,32	0,32	0,36
2B	14	F		vivax	V	1000	6,99	0,04	0,03	0,10
3B	14	M	0		V	10000	13,14	0,14	0,14	0,33
4B	18	F	0		V	3500	13,05	0,04	0,04	0,14
5B	15	F	0		V	4000	15,93	0,02	0,03	0,11
6B	14	M	0		V	1500	18,61	0,06	0,10	0,41
7B	23	M	0		V	8000	11,09	0,08	0,08	0,16
8B	36	M	1	vivax	V	5000	14,52	0,47	0,01	0,90
9B	26	F	1	mista	VF	40	8,19	0,53	0,60	0,77
10B	21	M	0		V	4500	17,13	0,05	0,18	0,31
11B	30	F	0		V					
12B	32	M	0		V	9500	19,52	0,60	43,89	0,99
13B	38	F	1		V	6000	10,70	0,03	0,01	0,05
14B	21	M	2	vivax	V	5000	15,29	0,39	0,37	0,92
15B	34	M	2	vivax	V	500	15,57	0,43	0,59	0,90
16B	78	F	1		V	13500				
17B	30	M	0		V	1000	15,91	0,01	0,01	0,09
18B	15	M	0		V	1500	16,19	0,48	0,71	0,99
19B	32	F	0		V	3500	16,55	0,00	0,01	0,20
20B	13	F	1	vivax	V	5000	15,58	0,25	0,09	0,86
21B	13	F	0		V	4000	11,27	0,03	0,01	0,08
22B	10	M	0		V	6500	14,33	0,13	0,13	0,38
23B	30	M	1		V	5000				
24B	26	M	0		V	500	2,42	0,08	0,00	0,07
25B	21	F	0		V	4000	13,97	0,04	0,05	0,20
26B	16	M	0		V	1000	17,34	0,02	0,00	0,56
27B	19	M	1		V	500	13,14	0,33	0,17	0,91
29B	28	M	0		V	2500	17,16	0,75	0,77	0,92
30B	31	F	0		V	200	7,49	0,04	0,00	0,02
31B	23	M	0		V	2000	17,50	0,09	0,02	0,65
32B	44	F	0		V	2000	10,20	0,06	0,05	0,13
34B	15	F	2		V	1500	14,85	0,62	1,83	1,03
35B	34	F	1		V	4000	0,49	0,13	0,00	0,24
36B	23	M	4		V	10000	15,65	0,42	0,00	0,90
37B	44	M	7	vivax	V	6000	5,55	0,29	0,31	0,46
38B	24	M	1		V	1000				
39B	18	M	0		V	1500	5,65	0,07	0,03	0,15
41B		M			V	2500	14,35	0,04	0,07	0,23
42B	22	F	0		V	1500	15,16	0,01	0,01	0,14
43B	20	M	1	vivax	V	6000				
44B	17	F	0		V	10000	14,46	0,01	0,02	0,16
45B	30	M	1		V	5000	15,52	0,20	0,47	0,99
46B	35	M	0		V	12000	14,03	0,03	0,05	0,16
47B	32	M	0		V	7000	14,89	0,04	0,05	0,18
48B	47	M	0		V	3500	17,23	0,05	0,03	0,46
49B	21	M	0		V	500	9,86	0,07	0,49	0,08
50B	26	F	2		V	5000	15,35	0,15	0,09	0,84
51B	29	F	0		V	1000	13,38	0,06	0,07	0,17
52B	28	M	0		V	2000	13,29	0,04	0,04	0,29
54B	42	M	0		V	20000	11,52	0,07	0,00	0,07

57B	28	M	0		V	1000	16,57	0,03	0,04	0,28
58B	30	F	0		V	2500	15,83	0,01	0,01	0,18
59B	14	M	0		V	1500	10,81	0,04	0,04	0,12
60B	56	F	1		V	2500	16,74	0,54	0,37	0,93

Anexo III

Dados pessoais dos pacientes de Igarapé Açu e resultados dos métodos Gota espessa e ELISA PvMSP1₁₉ (IR e IA)

AMOSTRA	IDADE	SEXO	Num mal ant	gota	PARASITEMIA	IR	IA 0,5U	IA CO	IA 1ª Dil
2IA	7	F		V		6,36	0,02	0,00	0,02
5IA	63	F		V	++V	8,05	0,09	0,09	0,21
6IA	26	M		V	++V	9,32	0,02	0,00	0,01
7IA	40	M		V		19,49	0,51	0,01	0,94
9IA	24	M		V	+2 V	12,84	0,02	0,01	0,06
10IA	34	F		V	+2 V	18,23	0,27	0,00	0,87
11IA	40	M		V	+2 V	5,47	0,14	0,12	0,15
12IA	47	M		V	++V	2,34	0,01	0,00	0,05
14IA	8	M		V	+V	6,78	0,02	0,00	0,01
16IA	10	M		V	++V	12,05	0,03	0,04	0,11
17IA	9	M		V	++V	4,22	0,08	0,00	0,03
18IA	25	F		V	+V	5,10	0,02	0,00	0,01
19IA	60	F		V	++V	1,65	0,03	0,00	0,01
20IA	42	M		V	+V	4,34	0,02	0,00	0,02
21IA	13	M		V	+V	5,16	0,01	0,00	0,02
22IA	46	M		V	++V	1,03	0,04	0,00	0,32
23IA	17	F		V	+2 V	8,41	0,08	0,06	0,12
24IA	15	M		V	+V	4,17	0,31	0,30	0,34
25IA	15	M		V	+V	2,53	0,06	0,00	0,06
27IA	34	M		V	+V	4,88	0,04	0,01	0,08
28IA	7	F		V	+2 V	9,23	0,06	0,06	0,21
29IA	21	F		V	++V	4,51	0,02	0,02	0,10
30IA	13	F		V	+2 V	1,49	0,28	0,27	0,58
31IA	10	F		V	+2 V	5,87	0,08	0,07	0,17
32IA	39	F		V		2,81	0,04	0,00	0,05
33IA	46	M		V	+2 V	5,56	0,03	0,00	0,06
34IA	36	M		V	+2 V	3,48	0,11	0,01	0,09
35IA	22	F		V	+2 V	10,59	0,03	0,01	0,04
36IA	29	M		V	++V	9,32	0,04	0,05	0,29
37IA	39	M		V	+V	12,18	0,23	0,33	0,73
38IA	21	F		V	+2 V	12,93	0,06	0,05	0,17
40IA	12	M		V	+V	3,66	0,05	0,00	0,08
41IA	6	M		V	++V	7,10	0,31	0,06	0,15
42IA	8	M		V	++V	10,24	0,03	0,02	0,08
43IA	6	M		V	+2 V	9,41	0,04	0,00	0,03
44IA	88	F		V	+2 V	4,50	0,19	421,76	0,10
45IA	22	M		V	+V	10,67	0,03	0,02	0,09
46IA	29	M		V	+2 V	8,69	0,02	0,01	0,07

47IA	43	M		V		5,87	0,18	0,19	0,25
48IA	6	M		V	+2 V	3,06	0,03	0,00	0,05
49IA	13	M		V	10 V	21,67	0,29	0,24	0,89
50IA	21	M		V	+2 V	6,41	0,03	0,02	0,10
51IA	24	F		V	10 V	9,41	0,04	0,00	0,03
52IA	5	F		V	+V	1,80	0,05	0,06	0,17
53IA	18	F		V	+V	6,96	0,19	0,06	0,14
55IA	37	F		V	++V	5,87	0,04	0,00	0,05
56IA	19	M		V	20 V	10,98	0,08	0,08	0,22
57IA	39	M		V	++V	8,59	0,03	0,02	0,09
58IA	20	M		V	+2 V	8,31	0,03	0,03	0,09
59IA	12	M		V	+2 V	11,01	0,09	0,06	0,11
60IA	51	M		V	15 V	1,45	0,38	0,00	0,18
61IA	35	M		V	+V	8,38	0,20	0,16	0,36
62IA	33	M		V	+2 V	4,63	0,04	0,00	0,06
63IA	5	M		V	20 V	5,47	0,04	0,00	0,03
64IA	8	F		V	+2 V	5,52	0,03	0,00	0,03
65IA	47	F		V	25 V	4,35	0,10	0,01	0,10
66IA	33	M		V	++	2,89	0,09	0,00	0,06
67IA	33	M		V	+2 V	3,88	0,03	0,00	0,05
69IA	37	F		V	10 V	11,63	0,03	0,02	0,11
70IA	19	F		V	+V	10,00	0,04	0,05	0,21
72IA	5	F		V	+V	7,45	0,03	0,01	0,06
73IA	49	M		V	20 V	3,49	0,16	0,09	0,18
74IA	21	F		V	15 V	5,86	0,15	0,00	0,07
75IA	20	F		V	++V	11,76	0,07	0,08	0,31
76IA	70	F		V	++V	8,80	0,01	0,01	0,23
77IA	38	M		V	++V	4,22	0,05	0,00	0,06
78IA	11	M		V	+V	5,75	0,11	0,08	0,19
79IA		M		V	++V	13,12	0,33	0,30	0,88
80IA	6	F		V	+2 V	10,08	0,03	0,01	0,07
81IA	7	M		V	++V	2,80	0,05	0,00	0,06
82IA	16	F		V	+2 v	15,29	0,04	0,04	0,13

Anexo IV

Dados pessoais dos pacientes da SUCEN e resultados dos métodos Gota espessa e ELISA PvMSP1₁₉ (IR e IA)

LOCAL	nº malárias	AMOSTRA	IR	IA 0,5U	IA CO	IA 1ª Dil
SUCEN	primo	54	7,69	0,03	0,01	0,07
SUCEN	primo	48	10,49	0,02	0,02	0,08
SUCEN	primo	17	4,22	0,02	0,03	0,08
SUCEN	primo	66	1,31	0,06	0,01	0,24
SUCEN	primo	516	4,65	0,16	0,17	0,24
SUCEN	primo	549	2,29	0,11	0,00	0,11
SUCEN	primo	553	6,43	0,05	0,03	0,10
SUCEN	primo	555	0,29	0,10	0,07	0,62
SUCEN	primo	562	4,76	0,05	0,01	0,07
SUCEN	primo	539	3,06	0,02	0,02	0,13
SUCEN	primo	574	9,71	0,05	0,05	0,24
SUCEN	primo	588	4,91	0,13	0,10	0,18

Anexo V

Dados pessoais dos pacientes da SUCEN acompanhamento e resultados dos métodos Gota espessa e ELISA PvMSP1₁₉ (IR e IA)

COLETA	AMOSTRA	IDADE	SEXO	Num mal ant	ultima mal	gota	IR	IA 0,5U	IA CO	IA 1º Dil
1º	1	28	M	0		PV++	7,2	0,69	0,49	0,94
1º	2	38	M	0		PV++	6,2	0,50	0,85	0,87
2º	2	38	M	0		PV++	9,5	0,57	0,36	0,77
3º	2	38	M	0		PV++	6,1	0,46	0,54	0,57
4º	2	38	M	0		PV++	2,6	0,11	0,20	0,56
1º	3	37	M	0		PV+	2,6	0,10	1,62	0,04
2º	3	37	M	0		PV+	6,3	0,20	46,32	0,81
3º	3	37	M	0		PV+	1,8	0,06	0,00	0,13
4º	3	37	M	0		PV+	0,4	0,03	0,01	0,07
1º	4	48	M	3	vivax	PV++	15,9	0,02	0,01	0,08
1º	5	39	M	6	vivax	PV+	13,5	0,02	0,01	0,06
2º	5	39	M	6	vivax	PV+	11,3	0,02	0,01	0,10
3º	5	39	M	6	vivax	PV+	5,1	0,02	0,01	0,06
1º	6	38	M	0		PV+/2	0,01	0,03	0,01	0,06
2º	6	38	M	0		PV+/2	2,5	0,10	0,12	0,28
1º	7	49	M	0		PV++	0,34	0,15	0,00	0,12
2º	7	49	M	0		PV++	6,2	0,01	0,01	0,07
1º	8	37	M	0		PF+	0,4	0,26	0,07	0,26
1º	9	38	F	0		PV+/2	2,1	0,14	0,06	0,16
1º	10	52	M	0		PV++	0,36	0,41	0,01	0,46
1º	11	39	M	25	falciparum	PV++	14,5	0,31	10,85	0,88
1º	12	56	M	0		PV++	0,09	0,45	100,90	0,75
1º	13	38	M	0		PV+/2	0,04	0,63	0,00	0,71
2º	13	38	M	0		PV+/2	6,1	0,34	0,32	0,48
3º	13	38	M	0		PV+/2	4,01	0,33	0,31	0,37

Anexo VI

Dados pessoais dos pacientes de Alta Floresta e resultados dos métodos Gota espessa e ELISA P_vMSP1₁₉ (IR e IA)

Coleta	Região	No Amostra	Idade	Sexo	Núm mal	Tempo UM	GOTA	Plasm	Tempo AF	IR 0,1	IA 0,5U	IA CO	IA 1ª DIL
1	4061	7	49	M	40	ATUAL	P.v. ++	Pv	18,00	25,660	0,63	0,63	0,95
1	4061	8	43	F	25	ATUAL	P.v. +/2	Pv	19,00	21,465	0,54	0,48	0,62
3	4061	61	52	M	100	ATUAL	pv	PF	12,00	5,825	0,54	0,41	0,44
3	4061	327	50	F	6	ATUAL	pv +	?	8,00	3,540	0,45	0,45	0,47
3	4061	330	18	F	10	ATUAL	pv+/2 pf3480/mm3	PV	16,00	11,680	0,37	0,36	0,50
3	4061	331	53	M	10	4 dias	neg	PF	15,00	4,455			
2	4061	21	11	M	10	5 dias	neg	Pf	3,00	0,820			
3	4061	55	33	F	32	7 dias	neg	PF	10,00	11,945	0,05	0,10	0,24
2	4061	289	32	F	30	10 dias	neg	Pv	10,00	1,660	0,34	0,11	0,32
2	4061	311	49	M	3	10 dias	neg	Pv	9,00	5,775	0,49	0,52	0,51
2	4061	318	27	M	15	10 dias	neg	Pv	10,00	21,285	0,63	0,78	0,90
3	4061	62	17	F	30	10 dias	neg	PF	12,00	5,510	0,73	0,64	0,69
3	4061	4	49	M	42	15 dias	neg	PF	19,00	3,100			
2	4061	308	52	F	1	15 dias	neg	Pv	13,00	1,155			
3	4061	336	60	F	20	15 dias	neg	PV	9,00	23,125			
3	4061	5	47	F	26	20 dias	neg	PF	19,00	12,070			
2	4061	8	19	M	20	20 dias	neg	Pf	18,00	10,510	0,51	0,45	0,56
2	4061	309	41	F	4	20 dias	neg	Pv	8,00	12,895	0,41	0,44	0,58
2	4061	316	18	M	5	20 dias	neg	Pv	10,00	7,055	0,21	0,13	0,20
3	4061	7	15	M	21	1 mês	neg	PV	15,00	8,675			
2	4061	9	15	F	10	1 mês	neg	Pv	15,00	0,755			
1	4061	19	9	F	1	1 mês	neg	Pf	9,00	4,540			
1	4061	22	44	M	1	1 mês	neg	Pv	18,00	3,025	0,07	0,00	0,15
2	4061	310	12	M	4	1 mês	neg	Pv	8,00	0,010			
2	4061	317	54	F	3	1 mês	neg	Pv	10,00	8,790	0,33	0,33	0,41
2	4061	315	20	F	6	40 dias	neg	Pv	10,00	9,495	0,16	0,17	0,22
3	4061	57	36	M	4	2 meses	neg	PF	6,00	5,275	0,45	0,46	0,57
2	4061	7	44	F	25	3 meses	neg	?	18,00	18,780			
3	4061	42	42	F	5	3 meses	neg	PV	9,00	6,835	0,80	0,35	0,83
3	4061	48	14	F	7	3 meses	neg	PV	14,00	0,330			
1	4061	52	20	F	4	4 meses	neg	Pv	12,00	3,180	0,68	0,59	0,65
2	4061	306	31	M	6	4 meses	neg	Pv	11,00	2,580			
3	4061	46	17	F	7	4 meses	neg	PF	17,00	3,850	0,26	0,13	0,29
3	4061	47	38	F	8	4 meses	neg	PV	18,00	0,210			
1	4061	11	10	F	10	5 meses	neg	?	10,00	0,255			
1	4061	20	16	M	1	5 meses	neg	Pv	15,00	0,080			
3	4061	43	60	M	8	5 meses	neg	PV	9,00	7,830	0,84	0,67	0,87

3	4061	44	61	F	6	5 meses	neg	PV	9,00	0,960			
1	4061	49	32	M	3	6 meses	neg	Pv	20,00	1,355			
3	4061	38	52	F	1	6 meses	neg	PV	14,00	3,000	0,55	1,99	0,57
3	4061	3	23	M	40	6 meses	neg	PV	19,00	9,460	0,83	0,65	0,84
3	4061	45	21	M	6	6 meses	neg	PV	9,00	11,015	0,79	0,69	0,88
3	4061	6	16	F	12	7 meses	neg	PV	16,00	0,160			
1	4061	50	47	F	12	7 meses	neg	Pv	12,00	11,955			
3	4061	2	20	M	20	7 meses	neg	PF	19,00	0,715			
3	4061	40	21	F	6	7 meses	neg	PV	11,00	0,035			
3	4061	41	54	F	3	7 meses	neg	PV	11,00	0,080			
2	4061	261	44	M	1	8 meses	neg	Pf	18,00	0,805			
1	4061	9	16	M	10	1 ano	neg	?	15,00	0,245			
1	4061	10	15	F	10	1 ano	neg	Pv	15,00	0,255			
2	4061	13	11	F	20	1 ano	neg	?	11,00	0,100			
2	4061	259	17	M	1	1 ano	neg	Pv	17,00	0,070			
1	4061	41	18	M	3	1 ano	neg	?	15,00	0,430			
2	4061	286	20	F	4	1 ano	neg	Pv	13,00	1,030			
1	4061	56	24	M	6	1 ano	neg	Pf	12,00	1,390			
2	4061	10	30	M	20	1 ano	neg	Pv	10,00	0,570			
2	4061	287	19	M	7	1 ano	neg	Pf	13,00	0,245			
2	4061	288	36	M	43	1 ano	neg	?	10,00	0,215			
3	4061	332	14	F	15	1 ano	neg	PV	14,00	3,310			
3	4061	334	27	F	2	1 ano	neg	PV	18,00	2,295			
3	4061	341	10	M	10	1 ano	neg	PV	6,00	0,570			
2	4061	15	17	F	1	1,3 anos	neg	?	11,00	0,235			
1	4061	51	23	M	15	1,33 anos	neg	Pf	12,00	9,035			
1	4061	5	55	F	3	16 meses	neg	?	15,00	1,390			
3	4061	1	11	F	21	1,5 anos	neg	Pv	11,00	0,265			
1	4061	42	11	F	4	1,5 anos	neg	?	11,00	0,885			
1	4061	43	13	F	3	1,5 anos	neg	?	13,00	3,010			
3	4061	64	33	M	3	1,5 anos	neg	PV	21,00	0,775			
3	4061	58	48	F	21	1,5 anos	neg	?	13,00	12,235			
3	4061	60	21	F	4	1,5 anos	neg	PV	13,00	1,150			
1	4061	72	9	M	3	1,5 anos	neg	Pf	9,00	0,235			
2	4061	4	23	M	2	1,5 anos	neg	Pf	17,00	0,475			
3	4061	59	19	M	7	1,5 anos	neg	PF	13,00	0,335			
3	4061	54	37	M	43	1,5 anos	neg	?	10,00	0,250			
2	4061	14	56	F	2	2 anos	neg	?	15,00	1,005			
2	4061	12	16	M	20	2 anos	neg	?	16,00	0,110			

1	4061	12	25	M	50	2 anos	neg	?	18,00	6,445			
1	4061	35	18	M	3	2 anos	neg	Pv	9,00	4,375			
2	4061	270	19	M	2	2 anos	neg	Pf	9,00	2,840			
1	4061	40	46	M	2	2 anos	neg	Pf	15,00	0,470			
1	4061	53	9	M	5	2 anos	neg	?	9,00	0,590			
2	4061	296	25	M	5	2 anos	neg	Pv	9,00	0,830			
2	4061	300	39	F	1	2 anos	neg	?	14,00	0,025			
1	4061	71	30	M	4	2 anos	neg	Pf	15,00	1,300			
1	4061	74	40	M	1	2 anos	neg	Pv	5,00	0,340			
2	4061	280	56	M	5	2 anos	neg	Pv	11,00	2,965			
3	4061	335	39	F	10	2 anos	neg	PF	7,00	0,585			
3	4061	338	16	M	10	2 anos	neg	PF	6,00	0,580			
3	4061	339	12	F	10	2 anos	neg	PF	6,00	0,795			
3	4061	340	11	F	8	2 anos	neg	PF	6,00	1,055			
3	4061	342	8	M	4	2 anos	neg	PF	6,00	1,935			
3	4061	343	17	F	5	2 anos	neg	PV	6,00	1,505			
3	4061	349	38	M	1	2 anos	neg	PV	17,00	0,250			
3	4061	351	10	M	3	2 anos	neg	PV	10,00	0,355			
2	4061	285	23	M	20	2,2 anos	neg	Pf	13,00	7,310			
3	4061	9	56	F	3	2,5 anos	neg	?	16,00	1,885			
2	4061	276	19	M	7	2,5 anos	neg	Pf	16,00	0,040			
3	4061	355	30	M	1	2,5 anos	neg	?	15,00	0,465			
1	4061	1	76	M	1	3 anos	neg	?	12,00	1,785			
1	4061	15	11	M	1	3 anos	neg	Pv	11,00	0,655			
3	4061	24	19	M	3	3 anos	neg	Pv	10,00	3,070			
1	4061	38	9	M	1	3 anos	neg	Pf	9,00	0,790			
2	4061	275	10	M	1	3 anos	neg	Pf	10,00	0,275			
2	4061	274	46	M	3	3 anos	neg	Pf	17,00	0,360			
2	4061	278	11	F	3	3 anos	neg	?	11,00	0,465			
2	4061	279	14	F	3	3 anos	neg	?	14,00	1,430			
2	4061	307	41	M	1	3 anos	neg	Pv	8,00	0,325			
2	4061	17	67	M	3	3 anos	neg	?	15,00	0,120			
2	4061	18	33	M	10	3 anos	neg	Pv	15,00	2,530			
3	4061	347	26	M	8	3 anos	neg	?	15,00	0,630			
3	4061	348	25	F	3	3 anos	neg	PV	8,00	0,455			
3	4061	350	12	F	2	3 anos	neg	?	12,00	0,180			
1	4061	25	18	M	10	4 anos	neg	Pf	10,00	0,625			
1	4061	26	59	M	10	4 anos	neg	Pf	10,00	0,315			
1	4061	47	13	F	1	4 anos	neg	Pf	9,00	1,025			
1	4061	48	63	F	2	4 anos	neg	Pv	20,00	0,650			
2	4061	282	64	F	2	4 anos	neg	Pv	8,00	0,515			
2	4061	290	10	M	6	4 anos	neg	Pf	10,00	0,265			
1	4061	70	30	F	1	4 anos	neg	Pv	15,00	0,270			
2	4061	281	36	F	1	4 anos	neg	?	8,00	0,655			
3	4061	328	27	M	15	4 anos	neg	?	8,00	2,285			
3	4061	329	58	M	8	4 anos	neg	?	8,00	0,370			

3	4061	29	37	F	1	4,5 anos	neg	?	9,00	0,325			
3	4061	63	64	F	2	5 anos	neg	PV	21,00	0,525			
2	4061	284	47	F	20	5 anos	neg	?	13,00	7,285			
3	4061	37	31	F	1	5 anos	neg	PV	17,00	0,080			
3	4061	28	7	M	1	5 anos	neg	PV	7,00	0,775			
3	4061	337	47	M	20	5 anos	neg	PV	7,00	1,705			
2	4061	265	55	M	30	6 anos	neg	Pf	10,00	0,550			
1	4061	45	25	F	3	6 anos	neg	Pv	10,00	0,400			
1	4061	55	12	F	1	6 anos	neg	Pv	12,00	0,255			
2	4061	24	43	M	1	6 anos	neg	Pf	18,00	0,230			
2	4061	291	26	M	40	6 anos	neg	Pv	13,00	0,605			
3	4061	346	64	M	7	6 anos	neg	PV	15,00	0,865			
3	4061	26	26	F	3	7 anos	neg	PV	11,00	0,010			
2	4061	293	36	F	1	7 anos	neg	Pv	2,00	0,280			
3	4061	50	36	F	1	7,5 anos	neg	PV	2,50	0,205			
2	4061	283	65	M	1	8 anos	neg	Pv	8,00	0,120			
3	4061	22	9	M	1	8 anos	neg	PF	9,00	0,010			
3	4061	65	66	M	1	8,5 anos	neg	PV	9,00	0,125			
2	4061	292	13	F	1	9 anos	neg	Pv	8,00	0,260			
2	4061	295	11	M	1	9 anos	neg	Pv	8,00	0,105			
2	4061	297	61	M	2	9 anos	neg	Pf	13,00	0,010			
2	4061	313	48	F	1	9 anos	neg	Pf	10,00	0,080			
3	4061	53	13	F	1	9,5 anos	neg	PV	9,50	0,535			
3	4061	51	12	M	1	9,5 anos	neg	PV	9,50	0,615			
3	4061	39	48	F	1	9,5 anos	neg	PF	11,00	0,010			
1	4061	28	22	F	1	10 anos	neg	?	12,00	1,065			
2	4061	298	29	M	1	10 anos	neg	Pv	18,00	0,105			
3	4061	49	30	M	1	10,5 anos	neg	PV	18,00	0,010			
3	4061	14	23	F	1	12 anos	neg	?	13,00	0,970			
2	4061	25	23	F	1	12 anos	neg	?	18,00	1,180			
2	4061	16	63	M	1	13 anos	neg	Pv	15,00	0,530			
1	4061	59	42	M	2	13 anos	neg	Pf	13,00	1,505			
3	4061	352	26	M	1	13 anos	neg	?	15,00	0,075			
1	4061	60	65	F	1	14 anos	neg	Pf	14,00	0,115			
2	4061	11	50	M	150	15 anos	neg	Pf	12,00	4,145			
1	4061	13	50	M	50	15 anos	neg	?	10,00	4,515			
3	4061	8	50	M	50	16 anos	neg	PF	12,00	2,945			
3	4061	353	55	M	1	55 anos	neg	?	13,00	0,135			
2	4061	1	29	M	0	0	neg	0	12,00	0,495			
1	4061	2	29	M	0	0	neg	0	10,00	1,210			
3	4061	308	30	M	0	0	neg	0	12,00	0,140			

1	4061	3	57	F	0	0	neg	0	15,00	0,720			
2	4061	3	57	F	0	0	neg	0	5,00	0,800			
3	4061	31	59	F	0	0	neg	0	5,00	0,045			
2	4061	5	4	F	0	0	neg	0	4,00	0,585			
3	4061	32	5	F	0	0	neg	0	5,00	0,055			
1	4061	14	33	F	0	0	neg	0	15,00	2,420			
1	4061	16	15	M	0	0	neg	0	15,00	0,360			
3	4061	10	36	F	0	0	neg	0	19,00	0,020			
1	4061	21	34	F	0	0	neg	0	8,00	0,675			
2	4061	257	35	F	0	0	neg	0	18,00	0,160			
1	4061	23	14	M	0	0	neg	0	14,00	0,220			
2	4061	260	14	M	0	0	neg	0	14,00	0,010			
3	4061	12	10	F	0	0	neg	0	10,00	0,045			
1	4061	24	9	F	0	0	neg	0	9,00	0,060			
1	4061	27	6	M	0	0	neg	0	6,00	0,550			
2	4061	266	6	M	0	0	neg	0	6,00	0,295			
3	4061	15	5	F	0	0	neg	0	5,00	0,040			
2	4061	26	5	F	0	0	neg	0	5,00	0,305			
3	4061	16	3	M	0	0	neg	0	3,00	0,070			
3	4061	18	51	F	0	0	neg	0	11,00	0,085			
1	4061	31	50	F	0	0	neg	0	10,00	0,655			
1	4061	32	16	F	0	0	neg	0	10,00	0,640			
1	4061	33	58	F	0	0	neg	0	9,00	0,865			
2	4061	268	58	F	0	0	neg	0	9,00	0,170			
3	4061	25	64	M	0	0	neg	0	10,00	0,110			
1	4061	34	60	M	0	0	neg	0	9,00	0,055			
2	4061	269	59	M	0	0	neg	0	9,00	0,955			
1	4061	36	40	F	0	0	neg	0	15,00	0,215			
2	4061	272	40	F	0	0	neg	0	9,00	0,345			
1	4061	37	14	M	0	0	neg	0	14,00	3,660			
2	4061	273	14	M	0	0	neg	0	14,00	3,210			
1	4061	39	15	M	0	0	neg	0	15,00	0,295			
1	4061	44	42	F	0	0	neg	0	15,00	0,050			
2	4061	277	43	F	0	0	neg	0	16,00	0,050			
3	4061	27	5	F	0	0	neg	0	5,00	0,010			
1	4061	54	42	F	0	0	neg	0	12,00	0,035			
1	4061	57	38	F	0	0	neg	0	13,00	0,340			
1	4061	58	71	M	0	0	neg	0	13,00	0,575			
2	4061	299	71	M	0	0	neg	0	14,00	0,090			
1	4061	73	51	F	0	0	neg	0	17,00	1,310			
1	4061	75	23	F	0	0	neg	0	14,00	3,190			
2	4061	2	69	F	0	0	neg	0	12,00	0,265			
3	4061	307	69	F	0	0	neg	0	12,00	0,225			
2	4061	6	69	M	0	0	neg	0	17,00	0,385			
2	4061	19	45	M	0	0	neg	0	8,00	0,165			
2	4061	20	9	F	0	0	neg	0	9,00	0,755			
2	4061	22	9	M	0	0	neg	0	8,00	0,195			
2	4061	23	3	F	0	0	neg	0	3,00	0,520			

3	4061	11	13	F	0	0	neg	0	9,00	0,080			
2	4061	258	12	F	0	0	neg	0	8,00	0,250			
2	4061	262	15	M	0	0	neg	0	3,00	0,755			
2	4061	263	54	F	0	0	neg	0	10,00	0,635			
2	4061	267	4	M	0	0	neg	0	0,25	0,135			
2	4061	271	19	F	0	0	neg	0	9,00	0,450			
3	4061	52	9	F	0	0	neg	0	3,50	0,370			
2	4061	294	8	F	0	0	neg	0	3,00	0,015			
2	4061	312	58	M	0	0	neg	0	10,00	0,085			
3	4061	13	18	M	0	0	neg	0	9,00	0,165			
3	4061	17	61	M	0	0	neg	0	11,00	0,010			
3	4061	19	21	M	0	0	neg	0	11,00	0,050			
3	4061	20	65	F	0	0	neg	0	1,00	0,010			
3	4061	21	32	M	0	0	neg	0	11,00	0,010			
3	4061	23	7	M	0	0	neg	0	7,00	0,010			
3	4061	30	8	M	0	0	neg	0	0,25	0,010			
3	4061	36	25	M	0	0	neg	0	19,00	0,265			
3	4061	345	59	F	0	0	neg	0	15,00	0,210			
3	4061	354	26	F	0	0	neg	0	15,00	0,135			
3	4061	356	24	M	0	0	neg	0	15,00	0,150			
3	4061	357	33	F	0	0	neg	0	15,00	0,115			
1	4061	6	63	M	1	?	neg	Pv	15,00	0,950			
1	4062	61	30	M	1	4 anos	neg	?	12,00	0,320			
1	4062	62	42	F	0	0	neg	0	3,00	0,345			
1	4062	63	30	F	0	0	neg	0	12,00	0,130			
1	4062	64	6	M	0	0	neg	0	6,00	0,395			
1	4062	65	9	F	0	0	neg	0	9,00	0,390			
1	4062	66	34	M	0	0	neg	0	12,00	0,150			
1	4062	67	24	F	0	0	neg	0	5,00	0,105			
1	4062	68	28	M	0	0	neg	0	5,00	0,070			
1	4062	76	20	F	0	0	neg	0	8,00	0,210			
1	4062	77	14	F	0	0	neg	0	8,00	0,270			
1	4062	78	72	M	0	0	neg	0	8,00	0,455			
1	4062	79	15	M	0	0	neg	0	8,00	0,295			
1	4062	80	28	F	0	0	neg	0	15,00	2,750			
1	4062	81	6	F	0	0	neg	0	6,00	0,135			
1	4062	82	31	M	0	0	neg	0	13,00	0,105			
1	4062	84	8	M	0	0	neg	0	8,00	0,245			
1	4062	85	58	M	0	0	neg	0	15,00	0,160			
1	4062	86	55	F	0	0	neg	0	15,00	0,370			
1	4062	87	9	M	0	0	neg	0	9,00	0,315			
1	4062	88	29	M	10	3 anos	neg	?	12,00	0,350			
1	4062	89	25	F	0	0	neg	0	10,00	0,215			
1	4062	90	7	F	0	0	neg	0	7,00	0,320			
1	4062	91	8	M	0	0	neg	0	8,00	0,110			
1	4062	26-B	34	M	0	0	neg	0	8,00	0,140			
1	4062	27-B	20	F	0	0	neg	0	6,00	0,210			
1	4062	28-B	6	M	0	0	neg	0	6,00	0,215			

1	4062	29-B	5	M	0	0	neg	0	5,00	0,315			
1	4062	30-B	23	M	200	0	P.v. +/2	?	8,00	13,685	0,32	0,24	0,50
1	4062	31-B	50	F	0	0	neg	0	8,00	0,285			
1	4062	32-B	5	F	0	0	neg	0	5,00	0,250			
1	4062	33-B	11	M	0	0	neg	0	8,00	0,340			
1	4062	34-B	30	M	2	3 anos	neg	?	20,00	0,155			
1	4062	35-B	23	F	0	0	neg	0	19,00	0,925			
1	4062	36-B	62	M	1	12 anos	neg	?	19,00	2,335	0,59	0,53	0,58
1	4062	37-B	30	M	5	1 ano	neg	Pv	9,00	2,205			
1	4062	38-B	26	F	6	1 ano	neg	Pv	9,00	0,475			
1	4062	39-B	10	M	0	0	neg	0	9,00	0,200			
1	4062	40-B	8	F	1	1 ano	neg	Pf	8,00	0,170			
1	4062	41-B	25	M	0	0	neg	0	7,00	0,230			
1	4062	42-B	31	M	0	0	neg	0	10,00	0,070			
1	4062	43-B	25	M	3	1 ano	neg	Pv	10,00	1,890			
1	4062	44-B	14	M	?	?	neg	?	10,00	0,035			
1	4062	45-B	24	M	1	7 anos	neg	?	10,00	0,040			
1	4062	46-B	21	F	0	0	neg	0	10,00	0,115			
1	4062	47-B	21	F	0	0	neg	0	9,00	0,105			
1	4062	48-B	30	F	1	4 anos	neg	?	9,00	0,235			
1	4062	49-B	20	F	0	0	neg	0	10,00	0,230			
1	4062	50-B	15	M	0	0	neg	0	10,00	0,035			
1	4062	51-B	8	F	0	0	neg	0	8,00	0,085			
1	4062	52-B	13	M	0	0	neg	0	10,00	0,025			
1	4062	53-B	27	F	0	0	neg	0	7,00	0,035			
1	4062	54-B	9	M	1	0	neg	Pv	7,00	15,000	0,03	0,02	0,11
1	4062	55-B	6	M	0	0	neg	0	6,00	0,170			
1	4062	56-B	11	F	0	0	neg	0	7,00	2,575			
1	4062	57-B	22	F	1	6 anos	neg	?	8,00	0,510			
1	4062	58-B	56	M	0	0	neg	0	10,00	0,125			
1	4062	59-B	56	F	0	0	neg	0	10,00	0,080			
1	4062	75-B	27	M	0	0	neg	0	6,00	0,070			
1	4062	76-B	21	F	0	0	neg	0	10,00	0,665			
1	4062	77-B	37	F	0	0	neg	0	15,00	0,150			
1	4062	78-B	38	M	0	0	neg	0	15,00	0,060			
1	4062	79-B	27	F	0	0	neg	0	13,00	0,065			
1	4062	80-B	38	F	1	6 meses	neg	?	18,00	0,230			
1	4062	81-B	40	M	2	2 anos	neg	?	18,00	0,150			
2	4062	28	52	M	1	7 anos	neg	?	9,00	0,310			
2	4062	29	30	M	0	0	neg	0	9,00	0,080			
2	4062	30	21	F	0	0	neg	0	9,00	0,075			
2	4062	31	19	F	0	0	neg	0	9,00	0,250			
2	4062	32	18	F	0	0	neg	0	9,00	0,095			
2	4062	33	8	F	0	0	neg	0	8,00	0,075			
2	4062	34	50	F	0	0	neg	0	9,00	0,160			
2	4062	35	27	M	2	4 meses	neg	Pf	12,00	0,120			

2	4062	36	13	M	0	0	neg	0	12,00	0,055			
2	4062	37	62	M	2	12 anos	neg	?	19,00	0,960			
2	4062	38	24	F	0	0	neg	0	18,00	0,040			
2	4062	39	25	M	30	3 meses	neg	Pv	8,00	0,435			
2	4062	40	56	M	1	5 meses	neg	Pf	10,00	3,785	0,41	0,31	0,41
2	4062	41	56	F	0	0	neg	0	10,00	0,135			
2	4062	42	38	M	0	0	neg	0	7,00	0,350			
2	4062	43	15	M	1	1 mês	neg	Pf	10,00	0,185			
2	4062	44	55	M	50	3 meses	neg	Pv	1,25	19,640	0,58	0,48	0,78
2	4062	45	6	M	0	0	neg	0	6,00	0,135			
2	4062	46	4	M	1	4 meses	neg	Pf	4,00	9,460	0,11	0,08	0,14
2	4062	47	23	F	1	4 anos	neg	Pf	8,00	0,300			
2	4062	48	25	M	0	0	neg	0	8,00	0,215			
2	4062	49	25	F	0	0	neg	0	8,00	0,060			
2	4062	50	15	F	1	2 meses	neg	Pv	8,00	5,590	0,15	0,08	0,17
2	4062	51	21	F	0	0	neg	0	8,00	0,155			
2	4062	52	9	M	0	0	neg	0	8,00	0,195			
2	4062	53	13	M	0	0	neg	0	8,00	0,380			
2	4062	54	72	M	0	0	neg	0	8,00	0,365			
2	4062	55	53	F	0	0	neg	0	16,00	0,295			
2	4062	56	19	F	0	0	neg	0	16,00	0,180			
2	4062	57	45	F	0	0	neg	0	15,00	0,120			
2	4062	58	21	F	0	0	neg	0	1,00	0,075			
2	4062	59	33	M	8	13 anos	neg	?	16,00	0,345			
2	4062	60	28	M	0	0	neg	0	16,00	0,375			
2	4062	61	19	F	1	2 anos	neg	Pf	6,00	0,930			
2	4062	62	62	F	0	0	neg	0	6,00	0,700			
2	4062	63	39	F	1	2 anos	neg	Pf	6,00	4,045			
2	4062	64	17	F	0	0	neg	0	6,00	0,505			
2	4062	65	10	F	0	0	neg	0	6,00	0,540			
2	4062	66	13	F	0	0	neg	0	6,00	0,035			
2	4062	67	35	M	1	10 anos	neg	Pf	12,00	0,415			
2	4062	68	11	F	1	?	neg	?	2,00	2,195			
2	4062	69	31	M	0	0	neg	0	13,00	0,435			
2	4062	70	28	F	0	0	neg	0	17,00	1,485			
2	4062	71	9	M	0	0	neg	0	9,00	0,085			
2	4062	72	7	F	0	0	neg	0	7,00	0,150			
2	4062	73	4	M	0	0	neg	0	4,00	0,040			
2	4062	74	30	M	8	4 anos	neg	?	14,00	0,635			
2	4062	75	26	F	0	0	neg	0	9,00	0,265			
2	4062	76	7	F	0	0	neg	0	7,00	0,095			
2	4062	77	9	M	0	0	neg	0	9,00	0,075			
2	4062	301	31	M	1	5 anos	neg	?	14,00	0,325			
2	4062	302	26	F	0	0	neg	0	0,08	0,505			
2	4062	303	34	M	0	0	neg	0	14,00	0,665			

2	4062	304	30	F	0	0	neg	0	14,00	0,050			
2	4062	305	9,9	F	0	0	neg	0	9,92	0,140			
2	4062	319	32	F	1	5 anos	neg	Pf	12,00	1,000			
2	4062	320	15	F	0	0	neg	0	12,00	0,300			
2	4062	321	10	M	1	5 anos	neg	Pv	6,00	3,610			
2	4062	322	7	M	0	0	neg	0	7,00	0,260			
2	4062	323	6	M	0	0	neg	0	6,00	0,250			
2	4062	324	21	F	0	0	neg	0	7,00	0,150			
2	4062	325	34	M	0	0	neg	0	8,00	0,200			
2	4062	326	7	M	0	0	neg	0	7,00	0,195			
2	4062	327	5	M	0	0	neg	0	5,00	0,575			
3	4062	33	40	M	1	2 anos	neg	PV	14,00	3,510			
3	4062	34	27	M	0	0	neg	0	0,50	0,330			
3	4062	35	31	F	0	0	neg	0	14,00	0,040			
3	4062	66	15	F	2	5 meses	neg	PV	9,00	9,005			
3	4062	67	21	F	0	0	neg	0	9,00	0,230			
3	4062	68	13	M	0	0	neg	0	9,00	0,155			
3	4062	69	26	F	0	0	neg	0	9,00	0,355			
3	4062	70	73	M	0	0	neg	0	9,00	0,475			
3	4062	71	29	F	0	0	neg	0	17,00	1,710			
3	4062	72	7	F	0	0	neg	0	7,00	0,245			
3	4062	73	4	M	0	0	neg	0	4,00	0,120			
3	4062	74	2,58	F	0	0	neg	0	2,58	0,415			
3	4062	75	27	F	1	8 anos	neg	PF	2,00	0,385			
3	4062	76	61	M	8	8 anos	neg	PF	16,00	1,085			
3	4062	77	40	F	2	?	neg	PV	16,00	3,535			
3	4062	78	11	F	8	8 anos	neg	PV	11,00	0,370			
3	4062	79	34	F	0	0	neg	0	12,00	0,335			
3	4062	80	14	F	0	0	neg	0	12,00	0,585			
3	4062	81	26	F	0	0	neg	0	11,00	0,250			
3	4062	82	8	F	0	0	neg	0	8,00	0,100			
3	4062	83	9	M	0	0	neg	0	9,00	0,090			
3	4062	84	9	M	0	0	neg	0	9,00	0,120			
3	4062	85	28	F	0	0	neg	0	14,00	0,265			
3	4062	86	20	M	2	1,5 anos	neg	PV	18,00	3,010			
3	4062	87	39	M	1	2 meses	neg	?	17,00	0,295			
3	4062	88	38	F	1	2 meses	neg	?	17,00	0,400			
3	4062	89	34	M	8	13,5 anos	neg	?	17,00	0,115			
3	4062	90	45	F	0	0	neg	0	16,00	0,350			
3	4062	91	40	M	20	3 meses	neg	PF	1,00	0,280			
3	4062	92	65	M	0	0	neg	0	11,00	1,380			
3	4062	93	28	M	0	0	neg	0	7,00	0,045			
3	4062	94	22	F	0	0	neg	0	11,00	0,050			
3	4062	95	46	F	0	0	neg	0	8,00	0,055			
3	4062	96	30	M	10	4 anos	neg	PF	14,00	1,180			

3	4062	196	23	M	1	12 dias	neg	PV	17,00	13,995	0,02	0,02	0,14
3	4062	247	31	M	0	0	neg	0	11,00	0,330			
3	4062	248	53	M	1	7,5 anos	neg	?	10,00	0,355			
3	4062	249	15	M	1	?	neg	?	11,00	0,265			
3	4062	250	24	M	0	0	neg	0	19,00	0,070			
3	4062	251	26	M	0	0	neg	0	8,00	0,115			
3	4062	252	22	F	0	0	neg	0	11,00	0,060			
3	4062	253	50	F	1	18 anos	neg	?	13,00	0,855			
3	4062	254	24	M	2	3 anos	neg	?	16,00	0,565			
3	4062	255	25	M	2	1 mês	neg	PV	13,00	23,765	0,42	0,28	0,80
3	4062	256	13	M	0	0	neg	0	13,00	0,325			
3	4062	257	17	F	0	0	neg	0	13,00	0,165			
3	4062	258	62	M	1	13 anos	neg	?	20,00	1,835	0,55	0,36	0,55
3	4062	259	23	M	4	1 mês	neg	PF	1,00	1,025			
3	4062	260	46	F	2	1mês	neg	PV	1,00	18,185			
3	4062	261	52	M	2	4 meses	neg	PV	1,00	1,350			
3	4062	262	12	M	2	2 meses	neg	PV	1,00	1,560			
3	4062	263	24	F	0	0	neg	0	20,00	0,415			
3	4062	264	39	M	0	0	neg	0	8,00	0,755			
3	4062	265	10	M	1	1 ano	neg	PV	8,00	2,630			
3	4062	266	6	M	0	0	neg	0	6,00	0,185			
3	4062	267	12	F	1	0	pv +/-2	PV	8,00	9,375	0,34	0,36	0,43
3	4062	268	28	F	2	7 dias	neg	PV	8,00	19,625			
3	4062	269	4	M	1	10 meses	neg	PF	4,00	1,770			
3	4062	270	3	F	3	1 mês	neg	?	3,00	17,410	0,17	0,17	0,38
3	4062	271	9	M	0	0	neg	0	9,00	0,095			
3	4062	272	9	M	3	4 meses	neg	PV	2,00	0,225			
3	4062	273	51	M	1	9 anos	neg	?	19,00	0,305			
3	4062	274	43	F	2	1 ano	neg	PF	18,00	0,360			
3	4062	275	57	M	1	1 ano	neg	PF	11,00	0,615			
3	4062	276	57	F	0	0	neg	0	11,00	0,415			
3	4062	277	26	M	31	9 meses	neg	PV	8,00	1,835			
3	4062	309	21	F	0	0	neg	0	7,00	0,105			
3	4062	310	35	M	0	0	neg	0	9,00	0,260			
3	4062	311	7	M	0	0	neg	0	7,00	0,055			
3	4062	312	5	M	0	0	neg	0	5,00	0,150			
1	4063	92	54	M	5	7 meses	neg	?	5,00	0,045			
1	4063	93	40	F	0	0	neg	0	5,00	0,015			
1	4063	94	17	F	1	?	neg	Pv	5,00	0,180			
1	4063	95	12	F	0	0	neg	0	5,00	0,010			
1	4063	96	6	M	0	0	neg	0	5,00	0,070			
1	4063	97	30	F	0	0	neg	0	17,00	0,020			
1	4063	98	34	M	2	2 anos	neg	Pf	14,00	0,015			
1	4063	100	13	M	0	0	neg	0	4,00	0,065			

1	4063	101	19	F	0	0	neg	0	4,00	0,075			
1	4063	102	60	M	2	1 ano	neg	Pf	9,00	0,025			
1	4063	106	53	M	0	0	neg	0	10,00	0,020			
1	4063	107	33	M	0	0	neg	0	9,00	0,010			
1	4063	109	28	M	1	2 meses	neg	Pv	1,67	3,950	0,10	0,00	0,09
1	4063	111	64	F	0	0	neg	0	1,67	0,010			
1	4063	112	25	F	0	0	neg	0	0,25	0,010			
1	4063	113	32	F	0	0	neg	0	10,00	0,010			
1	4063	117	7	F	0	0	neg	0	7,00	0,010			
1	4063	118	14	M	1	?	neg	?	14,00	0,180			
1	4063	119	47	M	3	2 anos	neg	Pv	10,00	0,010			
1	4063	120	85	M	0	0	neg	0	2,00	0,560			
1	4063	121	83	F	0	0	neg	0	2,00	0,090			
1	4063	122	40	M	0	0	neg	0	10,00	0,010			
1	4063	123	27	F	1	8 anos	neg	Pv	15,00	0,485			
1	4063	130	26	F	10	1 ano	neg	Pf	15,00	2,400			
1	4063	131	7	F	5	1 ano	neg	Pf	7,00	10,175			
1	4063	182	28	F	1	1,5 anos	neg	Pv	12,00	1,995			
1	4063	184	42	M	1	3 anos	neg	Pf	8,00	0,010			
1	4063	185	53	M	0	0	neg	0	11,00	0,010			
1	4063	186	49	F	0	0	neg	0	11,00	0,010			
1	4063	60-B	53	F	0	0	neg	0	4,00	0,115			
1	4063	62-B	21	M	0	0	neg	0	12,00	0,010			
1	4063	63-B	11	M	0	0	neg	0	11,00	0,010			
1	4063	64-B	46	M	0	0	neg	0	10,00	0,010			
1	4063	65-B	27	M	30	5 anos	neg	Pf	18,00	0,010			
1	4063	66-B	23	F	20	4 anos	neg	?	10,00	0,045			
1	4063	67-B	24	F	0	0	neg	0	2,58	0,010			
1	4063	68-B	5	M	0	0	neg	0	2,58	0,010			
1	4063	69-B	8	F	0	0	neg	0	2,58	0,010			
1	4063	70-B	26	M	0	0	neg	0	2,58	0,010			
1	4063	71-B	56	M	0	0	neg	0	17,00	0,240			
1	4063	72-B	55	F	1	47 anos	neg	?	0,67	0,010			
1	4063	73-B	54	M	1	42 anos	neg	?	0,67	2,215			
1	4063	74-B	29	F	0	0	neg	0	0,67	0,010			
1	4063	82-B	47	F	2	20 dias	neg	Pv	15,00	0,485			
1	4063	85-B	18	M	1	15 dias	neg	Pf	13,00	0,010			
1	4063	86-B	38	F	0	0	neg	0	13,00	0,010			
1	4063	87-B	20	F	0	0	neg	0	13,00	0,010			
1	4063	88-B	29	M	1	6 anos	neg	Pv	10,00	3,870			
1	4063	89-B	75	M	0	0	neg	0	10,00	0,010			
1	4063	90-B	30	M	5	1 ano	neg	Pv	10,00	0,650			
1	4063	91-B	25	M	2	3 anos	neg	?	10,00	0,010			
1	4063	92-B	66	M	2	ATUAL	P.f.120/mm3	Pv	14,00	0,485			
1	4063	93-B	25	F	0	0	neg	0	14,00	0,010			
1	4063	94-B	43	F	0	0	neg	0	14,00	0,010			

2	4063	78	58	M	1	2 anos	neg	Pv	18,00	0,035			
2	4063	79	54	F	0	0	neg	0	5,00	0,010			
2	4063	80	15	F	0	0	neg	0	7,00	0,010			
2	4063	81	19	F	0	0	neg	0	7,00	0,010			
2	4063	82	38	F	0	0	neg	0	16,00	0,010			
2	4063	83	22	M	0	0	neg	0	13,00	0,010			
2	4063	84	32	F	2	3 anos	neg	Pv	15,00	0,010			
2	4063	85	49	F	0	0	neg	0	10,00	0,010			
2	4063	86	18	M	1	8 meses	neg	?	10,00	10,275			
2	4063	87	19	F	0	0	neg	0	10,00	0,010			
2	4063	88	14	M	0	0	neg	0	10,00	0,010			
2	4063	89	10	M	0	0	neg	0	10,00	0,010			
2	4063	90	13	F	0	0	neg	0	10,00	0,010			
2	4063	91	7	M	0	0	neg	0	7,00	0,010			
2	4063	92	6	F	0	0	neg	0	6,00	0,100			
2	4063	93	27	F	0	0	neg	0	5,00	0,010			
2	4063	94	3,9	F	0	0	neg	0	3,92	0,010			
2	4063	95	2	M	0	0	neg	0	2,00	0,010			
2	4063	96	44	M	1	?	neg	?	6,00	0,035			
2	4063	97	38	F	0	0	neg	0	6,00	0,195			
2	4063	98	14	F	0	0	neg	0	6,00	0,200			
2	4063	99	38	F	0	0	neg	0	9,00	0,140			
2	4063	100	13	F	0	0	neg	0	9,00	0,295			
2	4063	101	10	F	3	8 meses	neg	?	9,00	0,010			
2	4063	102	5	F	0	0	neg	0	5,00	0,235			
2	4063	103	14	M	0	0	neg	0	9,00	0,140			
2	4063	104	8	M	0	0	neg	0	8,00	0,105			
2	4063	105	35	F	0	0	neg	0	16,00	0,135			
2	4063	106	10	M	0	0	neg	0	10,00	0,165			
2	4063	113	26	F	0	0	neg	0	10,00	0,035			
2	4063	328	18	M	0	0	neg	0	6,00	0,125			
2	4063	329	21	M	0	0	neg	0	6,00	0,430			
2	4063	331	31	F	0	0	neg	0	17,00	0,815			
2	4063	332	35	M	2	4 anos	neg	Pf	15,00	0,010			
2	4063	333	61	M	2	1,5 anos	neg	Pf	10,00	0,010			
2	4063	334	21	M	10	2 anos	neg	Pf	8,00	0,130			
2	4063	335	14	M	1	6 meses	neg	Pf	9,00	0,830			
2	4063	336	16	F	0	0	neg	0	9,00	0,390			
2	4063	337	19	F	0	0	neg	0	9,00	0,010			
2	4063	338	68	F	0	0	neg	0	9,00	0,150			
2	4063	339	67	M	0	0	neg	0	9,00	0,155			
2	4063	340	34	M	0	0	neg	0	9,00	0,265			
2	4063	341	65	F	1	60 anos	neg	?	1,00	0,325			
2	4063	342	28	F	30	2 anos	neg	Pv	11,00	0,045			
2	4063	343	38	F	30	2 anos	neg	Pf	0,33	0,010			
2	4063	344	11	M	3	3 anos	neg	Pv	0,33	0,010			

2	4063	345	17	F	5	8 anos	neg	Pv	0,33	0,055			
2	4063	346	13	M	4	3 anos	neg	Pv	0,33	0,550			
2	4063	347	14	F	3	3 anos	neg	Pv	0,33	0,010			
2	4063	348	7	M	1	4 anos	neg	Pv	0,33	0,010			
2	4063	349	48	M	2	20 dias	neg	?	14,00	18,965	0,46	0,42	0,72
2	4063	351	83	F	1	40 anos	neg	?	3,00	0,110			
2	4063	352	85	M	0	0	neg	0	3,00	0,380			
2	4063	353	15	F	0	0	neg	0	12,00	0,335			
2	4063	355	25	F	0	0	neg	0	3,00	0,095			
2	4063	356	8	F	0	0	neg	0	2,00	0,085			
2	4063	357	2	F	0	0	neg	0	3,00	0,020			
2	4063	358	50	F	0	0	neg	0	6,00	0,060			
2	4063	359	56	M	0	0	neg	0	15,00	0,270			
2	4063	360	22	F	7	1,5 anos	neg	Pf	16,00	0,065			
2	4063	361	25	M	20	2 meses	neg	Pv	5,00	2,265	0,56	0,19	0,47
2	4063	362	45	M	2	8 anos	neg	?	13,00	0,045			
2	4063	363	39	F	0	0	neg	0	13,00	0,850			
2	4063	364	18	M	0	0	neg	0	13,00	0,040			
2	4063	365	21	F	0	0	neg	0	13,00	0,030			
2	4063	366	28	M	1	2 anos	neg	Pf	11,00	0,395			
2	4063	367	10	F	0	0	neg	0	10,00	0,010			
2	4063	368	26	F	0	0	neg	0	14,00	0,190			
2	4063	370	44	F	0	0	neg	0	14,00	0,420			
2	4063	371	37	F	0	0	neg	0	0,50	0,010			
2	4063	372	25	F	0	0	neg	0	14,00	0,010			
2	4063	374	22	F	0	0	neg	0	11,00	0,020			
2	4063	375	75	M	0	0	neg	0	11,00	0,045			
2	4063	377	47	F	3	3 meses	neg	Pv	18,00	0,440			
3	4063	176	20	F	0	0	neg	0	7,00	0,010			
3	4063	177	68	F	0	0	neg	0	10,00	0,460			
3	4063	178	66	F	1	60 anos	neg	?	2,60	0,020			
3	4063	179	55	M	0	0	neg	0	11,00	0,105			
3	4063	180	28	F	30	2,5 anos	neg	PV	11,00	1,100			
3	4063	181	18	F	5	8,5 anos	neg	PV	0,83	0,525			
3	4063	182	36	F	30	2,5 anos	neg	PF	0,83	0,020			
3	4063	183	11	M	3	3,5 anos	neg	PV	0,83	0,810			
3	4063	184	7	M	1	4,5 anos	neg	PV	0,83	0,010			
3	4063	185	14	M	4	3,5 anos	neg	PV	0,83	3,675			
3	4063	186	15	F	3	3,5 anos	neg	PV	0,83	4,245			
3	4063	187	45	M	50	3 anos	neg	PV	5,00	0,130			
3	4063	188	30	M	6	4 anos	neg	PF	10,00	0,400			
3	4063	189	23	F	3	2 anos	neg	PV	10,00	0,010			
3	4063	190	6	M	0	ATUAL	pf 60/mm3	0	6,00	0,035			

3	4063	191	86	M	0	0	neg	0	3,00	0,670			
3	4063	192	84	F	1	40 anos	neg	?	3,00	0,015			
3	4063	199	24	F	20	5 anos	neg	?	11,00	0,995			
3	4063	200	2,9	F	0	0	neg	0	2,90	0,055			
3	4063	201	9	F	0	0	neg	0	3,00	0,015			
3	4063	202	25	F	0	0	neg	0	3,00	0,120			
3	4063	203	20	F	4	2 ano	neg	PV	12,00	9,250			
3	4063	204	51	F	0	0	neg	0	6,00	0,010			
3	4063	205	23	F	7	2 anos	neg	PF	16,00	0,010			
3	4063	206	46	M	2	8,5 anos	neg	?	13,00	0,035			
3	4063	207	39	F	0	0	neg	0	14,00	0,040			
3	4063	208	19	M	0	0	neg	0	14,00	0,035			
3	4063	209	16	M	1	4 anos	neg	?	16,00	0,605			
3	4063	210	11	F	0	0	neg	0	11,00	0,010			
3	4063	211	31	M	0	0	neg	0	15,00	0,010			
3	4063	212	45	F	0	0	neg	0	15,00	0,195			
3	4063	213	26	F	1	3 meses	neg	PV	15,00	0,245			
3	4063	214	65	M	3	3 meses	neg	PV	15,00	27,605	0,59	89,23	0,95
3	4063	215	37	F	0	0	neg	0	1,00	0,010			
3	4063	216	26	F	1	3 meses	neg	PV	14,00	0,030			
3	4063	217	60	F	2	3 meses	neg	PV	14,00	0,220			
3	4063	218	31	M	5	2 anos	neg	PV	11,00	0,125			
3	4063	219	30	M	2	3 meses	neg	PV	11,00	2,910	0,73	0,50	0,66
3	4063	220	75	M	0	0	neg	0	11,00	0,120			
3	4063	221	26	M	2	4 anos	neg	PV	11,00	0,855			
3	4063	222	69	M	3	1 mês	neg	PV	16,00	0,035			
3	4063	223	29	F	1	2,5 anos	neg	PV	13,00	0,010			
3	4063	224	36	F	2	16 anos	neg	PV	8,00	0,045			
3	4063	225	36	F	0	0	neg	0	16,00	0,010			
3	4063	226	11	M	0	0	neg	0	11,00	0,050			
3	4063	227	19	M	0	0	neg	0	12,00	0,010			
3	4063	228	31	M	0	0	neg	0	12,00	0,020			
3	4063	229	54	M	0	0	neg	0	12,00	0,020			
3	4063	230	27	M	0	0	neg	0	10,00	0,105			
3	4063	231	7	M	0	0	neg	0	7,00	0,315			
3	4063	232	26	F	0	0	neg	0	10,00	0,200			
3	4063	233	8	M	0	0	neg	0	8,00	0,010			
3	4063	278	58	M	10	8 meses	neg	PV	19,00	2,875			
3	4063	279	32	F	2	3,5 anos	neg	PV	15,00	2,055			
3	4063	280	8	M	0	0	neg	0	4,00	0,055			
3	4063	281	9	M	1	8,5 anos	neg	PV	9,00	0,015			
3	4063	282	12	M	0	0	neg	0	12,00	0,130			
3	4063	283	33	M	20	3 anos	neg	PF	14,00	0,055			

3	4063	284	48	M	0	0	neg	0	10,00	0,015			
3	4063	285	49	F	0	0	neg	0	10,00	0,020			
3	4063	286	14	F	0	0	neg	0	10,00	0,105			
3	4063	287	11	M	0	0	neg	0	10,00	0,180			
3	4063	288	8	M	0	0	neg	0	8,00	0,065			
3	4063	289	7	F	0	0	neg	0	7,00	0,070			
3	4063	290	34	M	0	0	neg	0	0,17	0,010			
3	4063	291	30	F	0	0	neg	0	0,17	0,010			
3	4063	292	13	M	0	0	neg	0	0,17	0,070			
3	4063	293	4	M	0	0	neg	0	0,17	0,010			
3	4063	300	55	M	5	1,5 anos	neg	?	6,00	0,015			
3	4063	301	40	F	0	0	neg	0	6,00	0,150			
3	4063	302	23	F	1	5,5 anos	neg	PF	6,00	7,170			
3	4063	303	18	F	1	?	neg	PV	6,00	0,265			
3	4063	304	16	F	2	5 anos	neg	?	10,00	1,800			
3	4063	305	66	F	0	0	neg	0	0,08	0,010			
3	4063	306	35	M	2	3 anos	neg	PF	15,00	0,445			
1	4064	133	13	M	0	0	neg	0	13,00	0,020			
1	4064	134	33	F	0	0	neg	0	17,00	0,010			
1	4064	135	45	F	0	0	neg	0	19,00	0,010			
1	4064	136	23	M	0	0	neg	0	19,00	0,010			
1	4064	137	20	M	0	0	neg	0	19,00	0,055			
1	4064	138	43	F	0	0	neg	0	10,00	0,205			
1	4064	139	15	F	0	0	neg	0	10,00	0,035			
1	4064	140	54	M	0	0	neg	0	12,00	0,010			
1	4064	141	50	F	0	0	neg	0	12,00	0,010			
1	4064	142	65	F	0	0	neg	0	7,00	0,780			
1	4064	143	75	M	0	0	neg	0	7,00	0,255			
1	4064	144	72	F	0	0	neg	0	12,00	0,420			
1	4064	145	49	F	0	0	neg	0	12,00	0,585			
1	4064	146	49	F	0	0	neg	0	12,00	0,225			
1	4064	147	21	F	0	0	neg	0	12,00	0,470			
1	4064	148	21	M	1	5 anos	neg	Pf	15,00	0,200			
1	4064	150	8	F	0	0	neg	0	8,00	0,835			
1	4064	151	21	F	0	0	neg	0	8,00	0,975			
1	4064	152	33	F	0	0	neg	0	10,00	0,140			
1	4064	187	13	M	0	0	neg	0	13,00	0,065			
1	4064	188	24	M	0	0	neg	0	17,00	0,340			
1	4064	189	67	F	0	0	neg	0	18,00	0,445			
1	4064	190	29	M	0	0	neg	0	18,00	0,495			
1	4064	191	21	M	0	0	neg	0	18,00	0,365			
1	4064	192	42	F	0	0	neg	0	7,00	0,400			
1	4064	193	14	F	1	12 anos	neg	Pv	14,00	0,010			
1	4064	194	18	M	0	0	neg	0	11,00	0,165			
1	4064	195	48	M	0	0	neg	0	11,00	0,570			
1	4064	196	48	F	0	0	neg	0	11,00	0,570			

1	4064	198	52	F	0	0	neg	0	15,00	0,305			
1	4064	199	32	M	0	0	neg	0	15,00	0,260			
1	4064	200	24	F	0	0	neg	0	10,00	0,365			
1	4064	201	30	F	0	0	neg	0	15,00	0,185			
1	4064	202	9	F	0	0	neg	0	9,00	0,270			
1	4064	203	28	M	0	0	neg	0	15,00	0,175			
1	4064	204	60	M	0	0	neg	0	15,00	0,745			
1	4064	205	24	F	0	0	neg	0	17,00	0,160			
1	4064	206	22	F	0	0	neg	0	17,00	0,585			
1	4064	207	49	F	0	0	neg	0	17,00	0,320			
1	4064	10-B	35	F	0	0	neg	0	9,00	0,380			
1	4064	11-B	14	F	0	0	neg	0	9,00	0,430			
1	4064	12-B	10	M	0	0	neg	0	9,00	0,355			
1	4064	13-B	8	F	0	0	neg	0	8,00	0,395			
1	4064	14-B	25	F	muitas	0	P.v. ++	?	?	23,130	0,32	0,00	0,94
1	4064	15-B	6	F	0	0	neg	0	6,00	0,515			
1	4064	17-B	15	F	1	3 anos	neg	Pv	15,00	1,170			
1	4064	18-B	34	F	4	1,5 anos	neg	Pf	17,00	8,030			
1	4064	19-B	8	M	1	3 anos	neg	Pv	8,00	3,205			
1	4064	1-B	31	F	1	1 mês	neg	Pv	10,00	0,010			
1	4064	20-B	11	M	1	1 ano	neg	Pf	11,00	1,570			
1	4064	21-B	28	M	3	15 dias	neg	?	1,00	0,070			
1	4064	22-B	60	M	0	0	neg	0	1,00	0,575			
1	4064	23-B	50	M	6	25 anos	neg	?	0,08	0,515			
1	4064	24-B	57	F	0	0	neg	0	0,67	0,905			
1	4064	25-B	18	M	2	11 meses	neg	Pv	1,00	0,195			
1	4064	2-B	10	F	0	0	neg	0	10,00	0,135			
1	4064	3-B	8	F	0	0	neg	0	8,00	0,250			
1	4064	5-B	11	M	0	0	neg	0	10,00	0,670			
1	4064	6-B	54	M	3	8 anos	neg	?	14,00	1,415			
1	4064	7-B	30	M	0	0	neg	0	10,00	0,630			
1	4064	8-B	51	M	1	9 anos	neg	Pf	17,00	0,105			
2	4064	114	27	F	0	0	neg	0	8,00	0,330			
2	4064	115	31	M	15	2,5 anos	neg	Pv	18,00	3,465			
2	4064	116	16	M	0	0	neg	0	16,00	0,310			
2	4064	117	32	F	0	0	neg	0	8,00	0,580			
2	4064	118	23	M	0	0	neg	0	18,00	0,010			
2	4064	119	48	M	0	0	neg	0	18,00	0,470			
2	4064	120	21	M	0	0	neg	0	18,00	0,010			
2	4064	121	45	F	0	0	neg	0	18,00	0,040			
2	4064	177	67	M	0	0	neg	0	16,00	1,030			
2	4064	178	59	F	0	0	neg	0	16,00	0,110			
2	4064	179	23	M	0	0	neg	0	16,00	0,295			
2	4064	180	24	M	0	0	neg	0	0,17	0,355			
2	4064	181	21	F	1	5 anos	neg	Pf	0,17	0,175			
2	4064	182	30	M	1	5 anos	neg	?	0,17	0,035			

2	4064	183	39	F	0	0	neg	0	18,00	0,565			
2	4064	184	16	F	0	0	neg	0	10,00	0,245			
2	4064	185	5	M	0	0	neg	0	5,00	0,520			
2	4064	186	43	F	0	0	neg	0	7,00	0,010			
2	4064	187	15	F	1	12 anos	neg	Pv	7,00	0,010			
2	4064	188	49	F	0	0	neg	0	10,00	1,140			
2	4064	189	48	M	0	0	neg	0	6,00	0,880			
2	4064	190	22	F	0	0	neg	0	6,00	0,385			
2	4064	191	36	M	3	1 mês	neg	Pv	8,00	1,200			
2	4064	192	31	F	1	1 ano	neg	Pv	8,00	0,240			
2	4064	193	10	F	0	0	neg	0	8,00	0,120			
2	4064	194	9	F	0	0	neg	0	8,00	0,155			
2	4064	196	52	M	2	6 meses	neg	?	18,00	0,190			
2	4064	197	16	F	1	5 meses	neg	Pf	7,00	0,100			
2	4064	198	44	M	0	0	neg	0	10,00	0,330			
2	4064	199	36	F	0	0	neg	0	10,00	0,330			
2	4064	200	34	M	10	7 meses	neg	?	9,00	0,580			
2	4064	201	29	M	3	6 meses	neg	?	2,00	0,170			
2	4064	202	31	F	1	1 ano	neg	?	2,00	3,705			
2	4064	203	12	M	0	0	neg	0	2,00	0,265			
2	4064	204	3	F	0	0	neg	0	2,00	0,375			
2	4064	205	10	M	0	0	neg	0	2,00	0,795			
2	4064	206	6	M	1	1 ano	neg	Pv	2,00	0,010			
2	4064	207	9	M	0	0	neg	0	2,00	0,045			
2	4064	208	58	M	2	3 meses	neg	Pv	12,00	0,030			
2	4064	209	36	M	1	6 meses	neg	Pf	12,00	0,085			
2	4064	210	47	M	2	4 anos	neg	Pf	18,00	5,080			
2	4064	211	39	F	1	12 anos	neg	?	18,00	0,035			
2	4064	212	22	M	6	1 mês	neg	?	18,00	0,060			
2	4064	213	19	F	0	0	neg	0	10,00	0,560			
2	4064	215	12	M	0	0	neg	0	12,00	0,125			
2	4064	216	22	M	14	10 meses	neg	?	14,00	0,980			
2	4064	217	14	F	0	0	neg	0	14,00	0,105			
2	4064	378	38	M	0	0	neg	0	15,00	0,245			
2	4064	379	34	F	0	0	neg	0	15,00	0,500			
2	4064	380	29	M	0	0	neg	0	15,00	0,185			
2	4064	381	31	F	0	0	neg	0	15,00	0,440			
2	4064	382	37	M	0	0	neg	0	15,00	0,485			
2	4064	383	60	M	0	0	neg	0	15,00	0,405			
2	4064	384	25	F	0	0	neg	0	10,00	0,250			
2	4064	385	24	F	0	0	neg	0	18,00	0,320			
2	4064	387	9	F	0	0	neg	0	1,25	6,325			
2	4064	388	12	F	0	0	neg	0	1,25	8,780			
2	4064	389	33	M	2	10 dias	neg	Pv	1,25	8,650	0,37	0,37	0,44

2	4064	390	34	F	1	40 dias	neg	Pv	1,25	3,915	0,14	0,01	0,13
2	4064	391	27	M	2	12 dias	neg	Pv	17,00	16,870	0,12	0,10	0,35
2	4064	394	9	M	2	20 dias	neg	Pv	9,00	19,640	0,08	0,13	0,49
2	4064	395	6	F	2	15 dias	neg	Pv	6,00	20,745	0,16	0,11	0,72
2	4064	397	28	F	1	2 meses	neg	Pv	15,00	8,150	0,13	0,10	0,19
2	4064	399	5	F	1	2 meses	neg	Pv	5,00	4,570	0,16	0,04	0,17
2	4064	400	11	M	1	1 mês	neg	Pv	11,00	2,650	0,03	0,00	0,12
2	4064	401	54	F	2	2 dias	neg	?	9,00	10,230	0,46	0,49	0,70
2	4064	403	8	M	1	40 dias	neg	Pv	8,00	18,280	0,08	0,08	0,21
2	4064	404	32	F	2	13 dias	neg	Pv	11,00	19,920	0,20	0,29	0,61
2	4064	405	100	M	2	15 dias	neg	Pv	10,00	3,690	0,25	0,17	0,22
2	4064	406	43	M	1	30 dias	neg	Pv	11,00	5,285	0,17	0,00	0,09
3	4064	193	22	M	2	5 meses	neg	PV	18,00	4,095	0,23	0,04	0,21
3	4064	194	29	F	2	3 meses	neg	PV	15,00	10,005	0,38	0,36	0,48
3	4064	195	5	F	1	8 meses	neg	PV	5,00	3,570			
3	4064	197	25	F	0	0	neg	0	11,00	0,095			
3	4064	198	31	F	0	0	neg	0	15,00	0,460			
3	4064	234	32	F	1	1 ano	neg	PV	11,00	0,015			
3	4064	235	36	F	0	0	neg	0	10,00	0,375			
3	4064	236	35	F	4	2,5 anos	neg	PF	18,00	9,060			
3	4064	237	59	M	2	9 meses	neg	PV	12,00	0,010			
3	4064	238	25	F	6	1 ano	neg	PV	11,00	0,010			
3	4064	239	19	F	0	0	neg	0	11,00	1,025			
3	4064	240	58	F	0	0	neg	0	1,70	0,770			
3	4064	241	61	M	0	0	neg	0	2,00	0,650			
3	4064	242	31	F	1	1,5 anos	neg	?	2,00	3,595			
3	4064	244	4	F	0	0	neg	0	2,00	0,065			
3	4064	245	19	M	1	6 meses	neg	PF	2,00	1,700			
3	4064	246	31	M	0	0	neg	0	11,00	0,695			
3	4064	294	20	M	0	0	neg	0	19,00	0,160			
3	4064	295	48	M	0	0	neg	0	19,00	0,105			
3	4064	296	46	F	0	0	neg	0	19,00	0,010			
3	4064	297	16	F	2	2 meses	neg	PV	11,00	0,105			
3	4064	298	44	F	3	10 dias	neg	PV	11,00	0,010			
3	4064	299	29	M	6	5 anos	neg	PV	20,00	0,215			
3	4064	313	43	M	3	45 dias	neg	PV	11,00	22,265	0,45	0,49	0,73
3	4064	314	60	F	0	0	neg	0	16,00	0,280			
3	4064	315	39	F	0	0	neg	0	18,00	1,270			
3	4064	316	42	F	0	0	neg	0	8,00	0,395			
3	4064	317	15	F	1	13 anos	neg	PV	8,00	0,010			
3	4064	318	54	M	2	3 anos	neg	?	8,00	0,020			
3	4064	319	23	M	3	3 anos	neg	PV	8,00	0,010			
3	4064	320	25	F	0	0	neg	0	18,00	0,360			
3	4064	321	23	F	0	0	neg	0	18,00	0,435			

3	4064	322	55	F	5	45 dias	neg	PV	9,00	2,730	0,30	0,09	0,30
3	4064	324	8	M	3	20 dias	neg	PV	8,00	13,645			
3	4064	325	9	M	1	7 meses	neg	PV	9,00	0,620			
3	4064	326	32	F	7	10 dias	neg	PV	11,00	2,405			
3	4064	358	34	F	0	0	neg	0	15,00	0,345			
3	4064	359	31	F	0	0	neg	0	7,00	0,495			
3	4064	360	29	F	0	0	neg	0	9,00	0,300			
3	4064	361	10	F	0	0	neg	0	9,00	0,225			
3	4064	362	4	M	0	0	neg	0	4,00	0,360			
3	4064	363	36	M	0	0	neg	0	9,00	0,445			
3	4064	364	32	F	0	0	neg	0	9,00	1,055			
3	4064	365	10	F	0	0	neg	0	10,00	0,090			
3	4064	366	35	M	0	0	neg	0	7,00	0,410			
3	4064	367	10	M	1	2 anos	neg	?	7,00	0,015			
3	4064	368	20	M	0	0	neg	0	7,00	2,240			
3	4064	369	26	F	0	0	neg	0	7,00	0,470			
3	4064	370	32	F	0	0	neg	0	2,00	0,955			
3	4064	371	22	F	0	0	neg	0	8,00	0,615			
3	4064	372	5	F	0	0	neg	0	2,00	0,575			
3	4064	373	5	F	0	0	neg	0	5,00	1,305			
3	4064	374	7	F	0	0	neg	0	7,00	0,055			
3	4064	375	24	M	0	0	neg	0	13,00	0,930			
3	4064	376	28	M	0	0	neg	0	2,00	0,015			
3	4064	377	33	M	0	0	neg	0	7,00	0,925			
3	4064	378	55	M	0	0	neg	0	9,00	0,545			
3	4064	379	55	F	0	0	neg	0	9,00	0,610			
3	4064	380	18	F	0	0	neg	0	9,00	0,160			
3	4064	381	22	F	0	0	neg	0	16,00	0,245			
3	4064	382	20	F	0	0	neg	0	15,00	0,145			
3	4064	383	48	M	4	30 dias	neg	PV	14,00	6,435	0,29	0,29	0,33
3	4064	384	53	F	1	45 anos	neg	?	6,00	0,290			
3	4064	385	24	M	0	0	neg	0	6,00	0,815			
3	4064	386	69	M	14	4 anos	neg	PV	18,00	0,095			
3	4064	387	65	M	6	3 anos	neg	PV	7,00	0,010			
3	4064	388	64	F	0	0	neg	0	0,33	0,090			
3	4064	389	25	M	15	4 anos	neg	?	15,00	0,010			
3	4064	390	5	M	0	0	neg	0	5,00	0,555			
3	4064	391	25	M	0	0	neg	0	3,00	0,285			
3	4064	392	45	F	0	0	neg	0	3,00	0,950			
3	4064	393	22	F	0	0	neg	0	3,00	0,405			
3	4064	394	22	F	0	0	neg	0	3,00	0,410			
3	4064	395	36	F	2	2 anos	neg	?	13,00	0,100			
3	4064	396	19	F	0	0	neg	0	3,00	0,235			
3	4064	397	23	F	0	0	neg	0	3,00	0,220			
3	4064	398	15	F	0	0	neg	0	3,00	0,565			
3	4064	399	20	M	0	0	neg	0	3,00	0,275			
3	4064	400	19	M	0	0	neg	0	13,00	0,205			

3	4064	401	19	F	0	0	neg	0	13,00	0,515			
1	4065	153	55	M	0	0	neg	0	15,00	0,045			
1	4065	157	38	M	0	0	neg	0	6,00	0,340			
1	4065	158	39	M	0	0	neg	0	0,33	0,560			
1	4065	179	39	F	0	0	neg	0	10,00	0,140			
1	4065	181	35	F	0	0	neg	0	6,00	0,105			
1	4065	132-B	9	M	0	0	neg	0	8,00	1,000			
1	4065	133-B	6	F	0	0	neg	0	6,00	0,460			
2	4065	152	5	F	0	0	neg	0	0,50	9,875			
2	4065	159	5	M	0	0	neg	0	8,00	4,035			
2	4065	169	5	M	0	0	neg	0	10,00	16,320			
2	4065	175	3	F	0	0	neg	0	3,00	0,675			
2	4065	218	55	M	0	0	neg	0	18,00	2,875			
2	4065	220	30	M	0	0	neg	0	10,00	2,670			
2	4065	223	40	M	0	0	neg	0	0,90	3,290			
2	4065	228	39	M	0	0	neg	0	8,00	2,010			
2	4065	233	6	F	0	0	neg	0	6,00	0,550			
2	4065	237	19	F	0	0	neg	0	7,00	1,100			
2	4065	244	22	F	0	0	neg	0	12,00	3,520			
2	4065	246	5	M	0	0	neg	0	5,00	0,660			
2	4065	248	5	M	0	0	neg	0	1,00	0,820			
2	4065	250	18	F	0	0	neg	0	0,50	2,660			
1	4065	111-B	19	F	?	?	neg	?	11,00	0,155			
1	4065	113-B	48	M	30	?	neg	?	17,00	0,240			
2	4065	234	7	M	2	?	neg	?	7,00	1,130			
3	4065	99	24	F	0	0	neg	0	12,00	2,395			
3	4065	103	25	F	0	0	neg	0	6,00	4,100			
3	4065	107	30	M	0	0	neg	0	14,00	1,050			
3	4065	109	31	M	0	0	neg	0	11,00	2,540			
3	4065	110	73	M	0	0	neg	0	12,00	3,755			
3	4065	111	30	M	0	0	neg	0	6,00	3,495			
3	4065	121	11	F	0	0	neg	0	3,00	2,085			
3	4065	123	54	F	0	0	neg	0	7,00	4,180			
3	4065	132	65	M	0	0	neg	0	10,00	17,655			
3	4065	135	15	M	0	0	neg	0	11,00	2,420			
3	4065	137	3	F	0	0	neg	0	3,00	0,770			
3	4065	141	7	M	0	0	neg	0	0,50	0,730			
3	4065	142	40	F	0	0	neg	0	9,00	2,850			
3	4065	143	31	F	0	0	neg	0	7,00	1,250			
3	4065	146	5	M	0	0	neg	0	1,50	0,840			
3	4065	147	54	M	0	0	neg	0	3,00	4,305			
3	4065	158	23	F	0	0	neg	0	12,00	3,050			
3	4065	171	30	F	0	0	neg	0	9,00	4,040			
3	4065	172	36	F	0	0	neg	0	8,00	2,760			
3	4065	174	15	F	0	0	neg	0	15,00	1,590			
1	4065	174	6	M	1	1 ano	neg	?	6,00	0,355			
1	4065	180	36	F	4	1 ano	neg	Pf	10,00	0,085			

1	4065	104-B	60	M	4	1 ano	neg	Pv	9,00	0,210			
1	4065	105-B	13	M	4	1 ano	neg	Pf	9,00	0,500			
1	4065	114-B	23	M	5	1 ano	neg	Pv	3,00	0,450			
1	4065	118-B	9	M	3	1 ano	neg	Pv	7,00	0,145			
2	4065	124	61	M	4	1 ano	neg	Pf	9,00	3,240			
2	4065	127	13	M	4	1 ano	neg	Pf	9,00	1,060			
2	4065	129	41	M	30	1 ano	neg	Pf	2,00	2,050			
2	4065	130	59	M	4	1 ano	neg	Pv	13,00	1,400			
2	4065	131	15	F	2	1 ano	neg	Pv	13,00	1,915			
2	4065	138	32	M	7	1 ano	neg	Pv	12,00	9,245			
2	4065	140	25	M	30	1 ano	neg	Pf	8,00	2,955			
2	4065	148	32	M	60	1 ano	neg	Pv	5,00	4,410			
2	4065	150	31	F	30	1 ano	neg	Pv	7,00	4,480			
2	4065	164	24	M	4	1 ano	neg	Pf	11,00	3,050			
2	4065	168	48	F	2	1 ano	neg	Pv	8,00	5,740			
2	4065	219	43	M	1	1 ano	neg	Pf	16,00	0,085			
2	4065	224	31	M	50	1 ano	neg	?	16,00	2,325			
2	4065	225	33	M	6	1 ano	neg	Pv	10,00	2,760			
2	4065	229	55	M	10	1 ano	neg	Pf	7,00	1,780			
2	4065	240	7	M	20	1 ano	neg	Pv	7,00	1,810			
3	4065	97	30	M	30	1 ano	neg	?	8,00	13,040			
3	4065	98	25	M	30	1 ano	neg	PF	5,00	1,895			
3	4065	116	23	M	5	1 ano	neg	PV	12,00	3,005			
3	4065	118	22	M	20	1 ano	neg	PV	4,00	6,965			
1	4065	112-B	38	M	1	1 mês	neg	Pv	10,00	0,200			
2	4065	141	22	M	70	1 mês	neg	Pv	2,00	1,825	0,49	0,25	0,44
3	4065	173	19	F	1	1 mês	neg	PF	8,00	0,685			
3	4065	145	27	F	1	1,1 anos	neg	PV	1,50	1,060			
3	4065	155	21	M	10	1,1 anos	neg	PV	4,00	4,790			
2	4065	122	25	F	10	1,2 anos	neg	Pf	7,00	1,510			
2	4065	147	35	M	20	1,2 anos	neg	Pf	1,00	1,960			
2	4065	156	8	M	1	1,2 anos	neg	Pf	8,00	0,980			
2	4065	157	6	M	2	1,2 anos	neg	Pf	6,00	0,550			
2	4065	241	45	F	20	1,2 anos	neg	Pv	14,00	1,990			
3	4065	122	32	F	6	1,2 anos	neg	PF	12,00	2,780			
2	4065	143	24	M	4	1,25 anos	neg	Pv	0,17	8,655			
3	4065	101	33	M	12	1,25 anos	neg	PF	10,00	8,460			
2	4065	132	18	M	10	1,33 anos	neg	Pv	13,00	2,110			
2	4065	242	11	F	6	1,33 anos	neg	Pf	11,00	1,765			
2	4065	255	4	F	1	1,4 anos	neg	Pf	0,17	4,390			
2	4065	154	32	M	5	1,5 anos	neg	Pv	8,00	6,300			
2	4065	243	12	F	2	1,5 anos	neg	Pf	12,00	0,805			

3	4065	119	30	F	10	1,5 anos	neg	?	6,00	2,625			
3	4065	127	9	M	20	1,5 anos	neg	PV	9,00	1,810			
3	4065	153	32	M	60	1,5 anos	neg	PV	5,00	4,845			
3	4065	156	24	M	100	1,5 anos	neg	?	4,00	5,250			
3	4065	170	42	F	4	1,5 anos	neg	PV	8,00	4,395			
2	4065	227	44	F	14	1,67 anos	neg	Pv	13,00	4,390			
3	4065	151	27	M	10	1,67 anos	neg	PF	8,00	17,050			
3	4065	129	46	F	20	1,7 anos	neg	PV	14,00	2,385			
1	4065	131-B	31	F	2	1,75 anos	neg	Pv	8,00	1,990			
2	4065	235	4	M	1	1,75 anos	neg	Pf	4,00	0,755			
3	4065	130	12	F	6	1,9 anos	neg	PF	11,00	2,625			
3	4065	166	43	M	3	10 anos	neg	PV	16,00	5,450			
1	4065	124-B	11	F	?	10 meses	neg	Pf	11,00	2,325			
1	4065	163	36	F	4	11 meses	neg	?	9,00	0,285			
1	4065	129-B	12	F	2	13 meses	neg	Pf	12,00	0,950			
3	4065	124	6	M	3	15 anos	neg	PF	6,00	0,665			
1	4065	167	28	M	30	15 dias	neg	Pv	8,00	6,445			
1	4065	107-B	48	M	2	15 dias	neg	Pv	10,00	0,200			
1	4065	108-B	27	M	30	15 dias	neg	Pf	5,00	1,165	0,72	0,00	0,19
2	4065	126	15	F	6	15 dias	neg	Pv	9,00	22,670	0,70	0,83	0,95
2	4065	145	37	M	30	15 dias	neg	Pv	3,00	6,930	0,32	0,30	0,31
2	4065	153	37	M	30	15 dias	neg	Pv	8,00	22,270	0,54	0,51	0,95
1	4065	154	36	M	4	2 anos	neg	?	4,00	0,305			
1	4065	161	18	M	5	2 anos	neg	Pf	6,00	0,050			
1	4065	166	20	M	10	2 anos	neg	Pv	9,00	0,800			
1	4065	171	52	F	1	2 anos	neg	?	8,00	0,925			
1	4065	173	50	F	2	2 anos	neg	?	7,00	0,180			
1	4065	175	10	M	2	2 anos	neg	Pv	10,00	0,255			
1	4065	176	14	M	1	2 anos	neg	Pf	10,00	0,785			
1	4065	178	11	M	1	2 anos	neg	Pv	10,00	0,170			
1	4065	116-B	6	M	2	2 anos	neg	Pv	6,00	0,080			
1	4065	120-B	54	M	20	2 anos	neg	?	8,00	0,410			
1	4065	122-B	15	F	4	2 anos	neg	Pv	8,00	0,350			
1	4065	125-B	43	F	3	2 anos	neg	Pv	8,00	15,895			
1	4065	128-B	17	M	4	2 anos	neg	?	8,00	1,260			
2	4065	167	52	F	1	2 anos	neg	?	11,00	3,180			
2	4065	222	60	M	1	2 anos	neg	?	13,00	1,695			
3	4065	104	25	F	50	2 anos	neg	?	13,00	2,605			
3	4065	112	60	M	4	2 anos	neg	PF	10,00	3,810			
3	4065	114	30	M	100	2 anos	neg	PV	1,00	3,325			
3	4065	120	29	M	100	2 anos	neg	PF	4,00	1,950			
3	4065	125	4	F	2	2 anos	neg	PF	4,00	1,010			

3	4065	128	13	F	2	2 anos	neg	PF	13,00	0,975			
3	4065	133	8	M	1	2 anos	neg	PV	8,00	1,215			
3	4065	149	5	F	1	2 anos	neg	PF	0,67	4,460			
3	4065	164	38	M	38	2 anos	neg	PV	15,00	3,715			
1	4065	103-B	15	F	2	2 meses	neg	Pv	12,00	0,725			
3	4065	126	20	F	5	2 meses	neg	PV	2,00	0,885	0,10	0,05	0,32
1	4065	121-B	42	F	1	2,25 anos	neg	Pv	8,00	0,410			
2	4065	231	31	F	2	2,3 anos	neg	?	8,00	1,950			
1	4065	162	34	M	4	20 dias	neg	Pv	12,00	7,365	0,40	0,41	0,42
2	4065	125	27	M	10	20 dias	neg	Pf	9,00	13,880	0,58	0,52	0,83
2	4065	151	48	M	20	20 dias	neg	Pv	5,00	2,160	0,75	0,56	0,65
1	4065	172	52	M	1	3 anos	neg	Pv	8,00	1,535			
2	4065	134	23	M	5	3 anos	neg	Pv	5,00	2,725			
2	4065	163	46	M	5	3 anos	neg	Pf	12,00	4,210			
2	4065	165	34	M	3	3 anos	neg	Pv	15,00	2,550			
2	4065	170	51	F	2	3 anos	neg	Pf	10,00	6,080			
2	4065	171	7	M	1	3 anos	neg	Pv	7,00	1,450			
2	4065	172	14	M	1	3 anos	neg	Pv	10,00	2,800			
2	4065	173	12	M	1	3 anos	neg	Pv	10,00	1,140			
2	4065	176	20	M	4	3 anos	neg	Pv	10,00	0,790			
2	4065	221	25	M	1	3 anos	neg	Pv	0,17	2,865			
2	4065	230	44	F	2	3 anos	neg	?	7,00	4,740			
2	4065	232	9	M	1	3 anos	neg	?	7,00	0,120			
2	4065	236	13	M	2	3 anos	neg	?	7,00	2,660			
2	4065	238	7	M	2	3 anos	neg	Pv	7,00	1,455			
2	4065	239	45	F	1	3 anos	neg	?	11,00	1,950			
3	4065	100	8	F	2	3 anos	neg	PV	8,00	0,965			
3	4065	108	21	F	3	3 anos	neg	PF	7,00	0,690			
3	4065	131	53	F	1	3 anos	neg	?	11,00	4,400			
3	4065	136	12	M	1	3 anos	neg	PV	11,00	0,975			
3	4065	157	55	M	20	3 anos	neg	?	9,00	2,040			
3	4065	161	16	F	4	3 anos	neg	PV	9,00	2,275			
3	4065	169	22	F	1	3 anos	neg	PV	8,00	1,950			
2	4065	135	20	M	10	3 dias	neg	Pv	4,00	23,900	0,58	8,43	0,97
1	4065	177	17	M	20	3 meses	neg	Pv	10,00	1,025			
2	4065	137	34	M	20	3 meses	neg	Pf	8,00	1,825	0,41	0,22	0,37
2	4065	142	54	M	200	3 meses	neg	?	2,00	13,955	0,58	0,55	0,68
2	4065	149	13	M	20	3 meses	neg	Pf	1,08	8,680	0,60	0,49	0,67
2	4065	249	28	M	1	3 meses	neg	Pv	0,50	0,495			
2	4065	253	28	F	11	3 meses	neg	Pf	0,17	1,500			
3	4065	154	24	M	6	3 meses	neg	PV	0,67	10,585	0,72	0,64	0,76
3	4065	160	44	F	1	3,1 anos	neg	Pv	9,00	4,165			
3	4065	134	11	M	2	3,5 anos	neg	PV	10,00	0,785			

3	4065	168	14	M	2	3,5 anos	neg	?	8,00	2,265			
3	4065	115	31	M	10	4 anos	neg	PF	10,00	3,200			
3	4065	165	65	M	1	4 anos	neg	?	10,00	1,260		não reagente	
1	4065	155	23	M	40	4 meses	neg	Pv	9,00	2,890	0,53	0,33	0,46
1	4065	156	40	F	3	4 meses	neg	Pv	0,75	7,535	0,25	0,23	0,26
1	4065	102-B	56	F	3	4 meses	neg	Pv	12,00	1,005			
2	4065	128	33	F	30	4 meses	neg	Pv	4,00	0,585			
3	4065	144	37	F	2	4 meses	neg	PV	13,00	9,310	0,16	0,18	0,32
1	4065	160	30	M	30	5 anos	neg	Pv	9,00	0,090			
1	4065	165	43	M	5	5 anos	neg	Pf	12,00	0,115			
2	4065	139	30	M	50	5 anos	neg	Pf	4,00	12,680			
2	4065	245	21	F	3	5 anos	neg	Pv	10,00	1,365			
3	4065	102	38	M	13	5 anos	neg	PV	11,00	5,660			
1	4065	100-B	25	F	8	5 meses	neg	Pf	7,00	0,360			
2	4065	133	8	F	2	5 meses	neg	Pv	8,00	1,000			
2	4065	160	23	M	10	5 meses	neg	Pv	9,00	3,545	0,48	0,15	0,39
2	4065	166	52	M	2	5 meses	neg	Pv	11,00	21,240	0,43	0,42	0,70
2	4065	254	6	F	5	5 meses	neg	Pf	0,17	1,805	0,52	0,13	0,37
2	4065	256	3	M	2	5 meses	neg	Pv	0,17	2,775	0,26	0,05	0,23
3	4065	152	31	M	50	5,5 anos	neg	PF	5,00	12,250			
3	4065	159	21	F	3	5,5 anos	neg	PV	10,00	1,245			
1	4065	169	32	M	1	6 anos	neg	Pf	5,00	0,245			
1	4065	127-B	28	M	10	6 anos	neg	Pv	11,00	4,120			
2	4065	226	32	M	1	6 anos	neg	Pf	7,00	2,275			
3	4065	163	35	M	3	6 anos	neg	PV	10,00	1,680			
1	4065	168	30	M	9	6 meses	neg	Pv	10,00	1,890	0,67	0,30	0,55
1	4065	106-B	33	M	9	6 meses	neg	?	10,00	1,285			
1	4065	110-B	20	F	4	6 meses	neg	Pv	1,00	1,485			
2	4065	136	27	M	15	6 meses	neg	Pf	6,00	13,810	0,30	0,30	0,43
2	4065	144	26	M	40	6 meses	neg	Pv	8,00	1,025			
2	4065	158	4	F	2	6 meses	neg	Pf	4,00	0,120			
2	4065	162	23	M	10	6 meses	neg	Pv	9,00	7,805	0,77	0,66	0,73
3	4065	105	7	M	10	6 meses	neg	?	7,00	1,945			
3	4065	113	16	F	6	6 meses	neg	PV	10,00	15,105	0,72	0,66	0,89
3	4065	150	21	M	20	6 meses	neg	PV	9,00	10,415	0,64	0,53	0,67
3	4065	138	39	M	5	7 anos	neg	?	15,00	3,440			
3	4065	139	26	F	4	7 anos	neg	PF	12,00	3,775			
3	4065	140	7	F	1	7 anos	neg	?	0,50	0,710			
2	4065	251	20	M	20	7 dias	neg	Pv	9,00	22,750	0,47	0,39	0,98

2	4065	252	19	M	2	7 dias	neg	Pv	1,25	22,905	0,48	7,74	0,92
2	4065	161	29	M	1	8 anos	neg	Pv	8,00	1,420			
3	4065	106	35	M	3	8 anos	neg	PF	15,00	2,615			
1	4065	126-B	54	M	1	8 dias	neg	Pv	9,00	7,400	0,23	0,24	0,43
1	4065	170	27	M	50	8 meses	neg	?	1,16	2,665			
1	4065	123-B	44	F	20	8 meses	neg	Pf	12,00	1,375			
2	4065	146	20	M	10	8 meses	neg	Pv	3,00	5,105			
2	4065	247	27	F	1	8 meses	neg	Pv	1,00	0,010			
3	4065	167	17	F	6	8 meses	neg	PF	10,00	1,720			
3	4065	162	29	M	1	8,5 anos	neg	PV	9,00	1,100			
1	4065	159	60	M	2	9 meses	neg	Pf	12,00	0,130			
1	4065	115-B	31	F	3	9 meses	neg	?	7,00	0,175			
2	4065	155	32	F	6	9 meses	neg	Pf	8,00	1,385			
3	4065	148	29	F	11	9 meses	neg	PF	0,67	3,555			
1	4065	109-B	31	M	20	atual	P.f.12000/mm3	Pv	0,25	0,735	0,29	0,00	0,06
1	4065	130-B	8	M	16	atual	P.f.240/mm3	Pf	8,00	0,105			
3	4065	117	26	M	20	atual	pf 60/mm3	PV	10,00	0,810	0,34	0,31	0,62

REFERÊNCIAS

Abbas AB, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Elseviers Saunders; 2005.

Achtman AH, Bull PC, Stephens R, Langhorne J. Longevity of the immune response and memory to blood-stage malaria infection. *Curr Top Microbiol Immunol. Immunol Immunopathol Mal*. 2005; 297: 71-102.

Adams JH, Sim KL, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 7085-7089.

Alecrim MGC. *Estudo clínico e terapêutico da malária pelo Plasmodium vivax e avaliação do polimorfismo no Estado do Amazonas* [tese]. Brasília: Universidade de Brasília: 2000.

Arévalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. *Molecular Immunology*. 2001; 38: 443-455.

Arias-Bouda LMP, Kuijper S, Van der Werf A, Nguyen LN, Jansen HM, Kolk AHJ. Changes in avidity and level of immunoglobulin G antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* in sera of patients undergoing treatment for pulmonary tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003; 10: 702-709.

Blackman MJ, Chappel JA, Shai S, Holder AA. A conserved parasite serine protease processes the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1). *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 62: 103-114.

Blackman MJ, Dennis ED, Hirst EMA, Kocken CH, Scott-Finnigan TJ, Thomas AW.. *Plasmodium knowlesi*: secondary processing of the malaria merozoite surface protein-1. *Exp Parasitol*. 1996; 83: 229-239.

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 the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med*. 1990; 172: 379-382.

Blackman MJ, Holder AA. Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP133 as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 50: 307.

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.* 1991a; 49: 29-34.

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: 389-393.

Blackman MJ, Whittle H, Holder AA. Processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1: identification of a secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. *Mol Biochem Parasitol.* 1991b; 49: 35-44.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.

Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, Bloland PB, Kaslow DC, Lal AA. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58: 211-219.

Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), Publicações Técnicas e Científicas, Vigilância Epidemiológica. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória de 1980 a 1998. *Boletim Epidemiológico – Edição Especial. Ano III.* Brasília, 1999.

Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), Vigilância Epidemiológica. *Resumo Executivo do PIACM (Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal).* Brasília, 2000.

Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), Vigilância Epidemiológica. *Relatório Executivo do PIACM (Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal)*. Brasília, 2002.

Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), Publicações Técnicas e Científicas, Centro Nacional de Epidemiologia. *Guia de Vigilância Epidemiológica – Malária*, 4^a ed. Brasília, 1998.

Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Serviços de Saúde Pública (FSESP), Divisão de Epidemiologia. *Boletim Epidemiológico*. Ano 15, Nº 10 e 11. P. 93-95. Rio de Janeiro, 1983.

Butler JE. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods*. 2000; 22: 4-23.

Camargo ME, Silva SM, Leser PG, Granato CH. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária pelo *Toxoplasma gondii*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1991; 33: 213-218.

Cattani JA, Tulloch JL, Vrbova H, Jolley D, Gibson FD, Moir JS, Heywood F, Alpers MP, Stevenson A, Clancy R. The epidemiology of malaria in a population surrounding Madang, Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 1986; 35: 3-15.

Chappel JA, Holder AA. Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion *in vitro* recognize the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 60: 303-312.

Chargelegue D, O'Toole CM, Colvin BT. A longitudinal study of the IgG antibody response to HIV-1 p17 gag protein in HIV-1+ patients with haemophilia: titre and avidity. 1993; 3: 331-336.

Chitnis EC. Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion. *Curr Opin Hematol*. 2001; 8: 85-91.

Chumpitazi BFF, Lepers JP, Simon J, Deloron P. IgG1 and IgG2 antibody responses to *Plasmodium falciparum* correlate inversely and positively, respectively, to the number of malaria attacks. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996; 14: 151-158.

Collins WE, Jeffery GM. A retrospective examination of sporozoite- and trophozoite-induced infections with *Plasmodium falciparum* in patients previously infected with heterologous species of *Plasmodium*: effect on development of parasitologic and clinical immunity. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61: 36-43.

Cooper JA. Merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium*. *Parasitology Today.* 1993; 9: 50-54.

Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine.* 2002; 20: 385-396.

Del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, Davi PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 4030-4034.

Dodoo D, Theander TG, Kurtzhals JA, Koram K, Riley E, Akanmori BD, Nkrumah FK, Hviid L. Levels of antibody to conserved parts of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun.* 1999; 67: 2131-2137.

Espinosa AM, Sierra AY, Barrero CA, Cepeda LA, Cantor EM, Lombo TB, Guzmán F, Avila SJ, Patarroyo MA. Expression, polymorphism analysis, reticulocyte binding and serological reactivity of two *Plasmodium vivax* MSP-1 protein recombinant fragments. *Vaccine.* 2003; 21: 1033-1043.

Ferreira MU e Katzin AM. The assessment of antibodies affinity distribution by thiocyanate elution: a simple dose-response approach. *J Immunol Methods.* 1995; 187: 297-305.

Ferreira MU, Kimura EAS, Souza JM, Katzin AM. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: Diferencial patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55: 315-323.

Fryauff DJ, Tuti S, Mardi A, Masbar S, Patipelohi R, Leksana B, Kain KC, Bangs MJ, Richie TL, Baird JK. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in transmigran settlements of West Kalimantan, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59: 513-518.

Galinski MR, Medina CC, Ingravallo P, Barnwell JW. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell.* 1992; 69: 1213-1226.

Garman SC, Simcoke WN, Stowers AW, Garboczi DN. Structure of the C-terminal domains of merozoite surface protein-1 from *Plasmodium knowlesi* reveals a novel histidine binding site. *J Biol Chem.* 2003; 278: 7264-7269.

Gerber NU. *Avidity of IgG1 antibodies to tetanus toxoid: Development of an isothiocyanate elution assay and assessment of avidity distribution in a population of health children* [thèse]. Genève: Faculté de Medecine; Université de Genève; 2002.

Gibson HL, Tucker JE, Kaslow DC, Krettli AU, Collins WE, Kiefer MC, Bathurst JC, Barr PJ. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 50: 325-334.

Good MF. Vaccine-induce immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitol.* 2005; 21 (1): 29-34.

Granoff DM, Maslanka SE, Carlone GM, Plikaytis BD, Santos GF, Mokatrin A, Raff HV. A modified enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to meningococcal C polysaccharide that correlate with bactericidal responses. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998; 5: 479-485.

Gray D. A role for antigen in the maintenance of immunological memory. *Nat Rev Immunology*, 2: 60-65, 2002.

Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prevent Vet Med*. 2000; 45: 23-41.

Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol*. 2006; 22 (8): 353-358.

Gunewardena DM, Carter R, Mendis KN. Patterns of acquired anti-malarial immunity in Sri Lanka. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89(2): 63-65, 1994.

Gusmão R d'A. Overview of malaria control in the Americas. *Parassitologia*. 1999; 41: 355-360.

Gutierrez A, Vicini J, Patarroyo ME, Murillo LA, Patarroyo MA. *Plasmodium vivax*: polymorphism in the merozoite surface protein 1 gene from wilde Colombian isolates. *Asp Parasitol*. 2000; 95: 215-219.

Hedman K, Lappalainen M, Seppä I, Mäkelä O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis*. 1989; 159: 736-740.

Hirunpetcharat C, Tian J-H, Kaslow DC, van Rooijen N, Kumar S, Berzofsky JA, Miller LH, Good MF. Complete protective immunity induce in mice by immunization with the 19-kilodalton Carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1₁₉) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: Correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4⁺ cells. *J Immunol*. 1997; 159: 3400-3411.

Holder AA, Guevara Patino JA, Uthaipibull C, Syed SE, Ling IT, Scott-Finnigan T, Blackman MJ. Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parasitologia*. 1999; 41: 409-414.

Holder AA, Sandhu JS, Hillman Y, Davey LS, Nicholls SC, Cooper H, Lockyer MJ. Processing of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*. 1987; 94: 199-208.

Holder AA. The Precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy*. 1988; 41: 72-97.

Hornick CL, Karush F. Antibodies affinity. III. The role of multivalence. *Immunochemistry*. 1972; 9: 325.

Hui GSN, Nikaido C, Hashiro C, Kaslow DC, Collins EW. Dominance of conserved B-cell epitopes of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein, MSP-1, in blood-stage infections of naïve *Aotus* Monkeys. *Infect Immun*. 1996; 1502-1509.

Jangpatarapongsa K, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Cui L, Montgomery SM, Looareesuwan S, Troye-Blomberg M, Udomsangpetch R. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. *Microbes Infect*. 2006; 8 (3): 680-686.

Jelinek T, Schulte C, Behrens R, Grobusch MP, Coulaud JP, Bisoffi Z, Matteelli A, Clerinx J, Corachán M, Puente S, Gjørup I, Harms G, Kollaritsch H, Kotlowski A, Björkmann A, Delmont JP, Knobloch J, Nielsen LN, Cuadros J, Hatz C, Beran J, Schmid ML, Schulze M, Lopez-Velez R, Fleischer K, Kapaun A, McWhinney P, Kern P, Atougia J, Fry G, da Cunha S, Boecken G, and for the European Network on Surveillance of Imported Infectious Diseases (TropNetEurop). Imported *Falciparum* malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*. 2002; 34: 572-576.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen A-G. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol*. 1997; 35 (8): 1972-1977.

Jongwutives S, Tanabe K, Kanbara H. Sequence conservation in the C-terminal part of the precursor to the major merozoite surface proteins (MSP1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 59:95-100.

Karunaweera ND, Wijesekera SK, Wanasekera D, Mendis KN, Carter R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol.* 2003; 19: 188-193.

Kim S, Ahn H-J, Kim T-S, Nam HW. ELISA detection of vivax malaria with recombinant multiple stage-specific antigens and its applications to survey of residents in endemic areas. *Korean J Parasitol.* 2003; 41 (4): 203-207.

Kitchen SF. The infection of reticulocytes by *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med.* 1938; 18: 347-359.

Korenromp E. Malaria incidence estimates at country level for the year 2004 – Proposed estimates and draft report – *World Health Organization, Roll Back Malaria.* 2004.

Kwiatkowski D. The molecular genetic approach to malarial pathogenesis and immunity. *Parassitology.* 1999; 41: 233-240.

Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann Ist Sanità.* 2004; 40 (1): 81-88.

Lazzarotto T, Galli C, Pulvirenti R, Rescaldani R, Vezzo R, Gioia Ala, Martinelli C, Rocca La, Agresti G, Grillner L, Nordin M, Van ranst M, Combs B, Maine GT, Landini MP. Evaluation of the abbott AxSYM cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin M (IgM) assay in conjunction with other CMV IgM tests and a CMV IgG avidity assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8: 196-198.

Leoratti FMS. *Resposta immune humoral na malaria humana: quantidade e qualidade de anticorpos anti-Plasmodium falciparum* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Levitus G, Mertens F, Speranca 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 the *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51 (1): 68-76.

Lim CS, Kim SH, Kwon SI, Song JK, Lee KN. Analyses of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 gene sequence from resurgent Korean isolates. *Am J Trop Med Hyg*. 2000; 62: 261-265.

Lim KJ, Park JW, Yeom J-S, Lee Y-H, Yoo SB, Oh JH, Sohn MJ, Bahk YY, Kim YS. Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in person exposed to *Plasmodium vivax*. *Parasitol Res*. 2004; 92: 384-389.

Maestre A, Sunil S, Ahmad G, Mohmmmed A, Echeverri M, Corredor M, Blair S, Chauhan V, Malhotra P. Inter-allelic recombination in the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene among Indian and Colombian isolates. *Mal J*. 2004; 3: 4.

Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cadernos Saúde Coletiva*. 2003; 11: 7-31.

Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296: 301-305.

McBride JS, Heidrich H. Fragments of the polymorphic Mr185,000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. *Mol Biochem Parasitol*. 1987; 23: 71-84.

McCloskey N, Turner MW, Goldblatt D. Correlation between the avidity of mouse-human chimeric IgG subclass monoclonal antibodies measured by solid-phase elution ELISA and biospecific interaction analysis (BIA). *J Immunol Methods*. 1997; 205: 67-72.

Mechain B, Garin YJ-F, Robert-Gangneux F, Dupouy-Camet J, Derouin F. Lack of utility of specific immunoglobulin G antibody avidity for serodiagnosis of reactivated toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7 (4): 703-705.

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

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002; 415: 673-679.

Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *New Eng J Med*. 1976; 302-304.

Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 59: 1-14.

Ministério da Saúde 2006. Saúde. Série histórica de casos e óbitos de doenças de notificação compulsória – Brasil, 1980 a 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/>

Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2005 [folder]. Brasília; 2005.

Mons B, Croon JJAB, Star WVan Der, Kaay HJVan Der. Erythrocytic schizogony and invasion of *Plasmodium vivax* *in vitro*. *Int J Parasitol*. 1988; 18: 307-311.

Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU, Braga EM. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitol Res*. 2005; 95: 420-426.

Morgan WD, Birdsall B, Frenkiel TA, Gradwell MG, Burghaus PA, Syed SHE. Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *J Mol Biol*. 1999; 209: 113-122.

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. *Infect Immun*. 2006; 74 (5): 2726-2733.

Nwuba RI, Sodeinde O, Anumudu CI, Omosun YO, Odaibo AB, Holder AA, Nwagwu M. The human immune response to *Plasmodium falciparum* includes both antibodies that inhibit merozoite surface protein 1 secondary processing and blocking antibodies. *Am Soc Microbiol.* 2002; 70: 5328-5331.

Okech BA, Corran PH, Todd J, Joynson-Hicks A, Uthaipibull C, Egwang TG, Holder AA, Riley EM. Fine specificity of serum antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein, P_fMSP-119, predicts protection from malaria infection and high-density parasitemia. *Am Soc Microbiol.* 2004; 72: 1557-1567.

OMS 2003 – World Health Report 2003: Shaping the future. Disponível em: <http://ibm.who.int>

OMS 2005 – World Malaria Report 2005 – Roll Back Malaria – Disponível em: <http://ibm.who.int>

OPAS, 2003. Informe da situação dos programas de malária nas Américas. CD44/INF/3.

Park JW, Moon SH, Yeom JS, Lim KJ, Sohn MJ, Jung WC, Cho YJ, Jeon KW, Ju W, Ki CS, Oh MD, Che KW. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. *Clin Diag Lab Immunol.* 2001; 8: 14-20.

Peterson MG, Coppel RL, Moloney MB, Kemp DJ. Third form of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol.* 1998; 8: 2664-2667.

Prince HE, Leber AL. Validation of an in-house assay for Cytomegalovirus immunoglobulin G (CMV IgG) avidity and relationship of avidity to CMV IgM levels. *Clin Diag Lab Immunol.* 2002; 9 (4): 824-827.

Prince HE, Wilson M. Simplified assay for measuring *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity. *Clin Diag Lab Immunol.* 2001; 8 (5): 904-908.

Pullen GR, Fitzgerald MG, Hosking CS. Antibodies avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Methods*. 1986; 86: 83-87.

RieckmanN KH, Davis DR, HutTon DC. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet*. 1989; 2: 1183-1184.

Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, Takacs B, Shonfeld HJ, Holder AA, Greenwood BM. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol*. 1992; 14: 321-337.

Robertson P, Beynon S, Whybin R, Brennan C, Vollmer-Conna U, Hickie I, Lloyd A. Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. *J Med Virol*. 2003; 70: 617-623.

Rodrigues MHC, Cunha MG, Machado RLD, Jr Ferreira OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. *Mal J*. 2003; 2: 39.

Rodrigues MHC. *Avaliação comparativa do reconhecimento imune de proteínas recombinantes derivadas de antígenos de superfície de merozoítas de Plasmodium vivax* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2004.

Rosa DS, Tzelepis F, Cunha MG, Soares IS, Rodrigues MM. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. *Immunol Letters*. 2004; 92: 259-268.

Sachdeva S, Ahmad G, Malhotra P, Mukherjee P, Chauhan VS. Comparison of immunogenicities of recombinant *Plasmdium vivax* merozoite surface protein 1 19- and 42-kilodalton fragments expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2004; 72 (10): 5775-5782.

Soares IS, Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Longevity of naturally acquired antibodies responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg.* 1999a; 60 (3): 357-363.

Soares IS, Levitus G, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *P. vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect Immun.* 1997; 65: 1606-1614.

Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C-terminal regions of *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.* 1999b; 72: 13-24.

Soares IS, Rodrigues MM. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. *Parasitology.* 2002; 124: 237-246.

Spencer HC, Miller LH, Collins WE, Knud-Hansen C, McGinnis MH, Shiroishi T, Lobos RA, Feldman RA. The Duffy blood group and resistance to *Plasmodium vivax* in Honduras. *Am J Trop Med Hyg.* 1978; 27: 664-670.

Srisurapanon S, Wiwattanakul S, Apibal S, Suwannuruk R, Sujimanaskul S, Petchsuwan B, Pattanapanyasat K. Lymphocyte subpopulations in malaria infected individuals living in an endemic area, Southeast Asian. *Am Trop Med Public Health.* 2003; 34: 310-315.

Stephens R, Langhorne J. Priming of CD4⁺ T cells and development of CD4⁺ T cell memory; lessons for malaria. *Parasite Immunol.* 2006; 28: 25-30.

Stevenson MM e Riley EM. Innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 169-180.

Steward MW, Chargelegue D. Overview: measurement and biological significance of antibody affinity and reactivity. In: Herzenberg LA, Weir DM, Blackwell C. *Weir's Handbook of Experimental Immunology – Cell Surface and Messenger Molecules of the Immune System*. 5 ed. Cambridge (Massachusetts): Blackwell Science; 1996. 38.1-38.35.

Struik SS, Riley EM. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunological Reviews*. 201; 268-290, 2004.

Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol*. 1987; 195, 273-287.

Tanyuksel M, Guney C, Araz E, Saracli MA, Doganci L. Performance of the immunoglobulin G avidity and enzyme immunoassay IgG/IgM screening tests for differentiation of the clinical spectrum of toxoplasmosis. *The J Microbiol*. 2004; 42: 211-215.

Thomas HI, Morgan-Capner P. Rubella-specific IgG1 avidity: a comparison of methods. *J Virol Methods*. 1991; 31 (2-3): 219-228.

Thomas HIJ. Relative functional affinity of specific anti-core IgG in different categories of hepatitis B virus infection. *J Med Virol*. 1997; 51: 189-197.

Tsuboi T, Kappe SHI, Al-Yaman F, Prickett MD, Alpers M, Adams JH. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infection and Immunity*. 1994; 62: 5581-5586.

Welch SG. The Duffy blood group and malaria prevalence in Gambian West Africans. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1977; 71: 295-296.

Whitby M. Drug resistant *Plasmodium vivax* malaria. *J Antimicrobiological Chemotherapy*. 1997; 40: 749-752.

Yoshida M. *Estudo de anticorpos IgG anti-Paracoccidioides brasiliensis em soro e fluido oral como marcadores no diagnóstico e controle pós-terapêutico da paracoccidioidomicose. Avaliação da avidéz de IgG sérica anti-Paracoccidioides brasilienses* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.