
DetECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIMALÁRICOS EN UN GRUPO DE ESCOLARES DEL MUNICIPIO DE EL BAGRE, ANTIOQUIA

SILVIA BLAIR, LEONARDO A. RÍOS,
MARCELA ECHEVERRI, ISABEL POLANCO

En 1996, en el municipio de El Bagre (Antioquia-Colombia), zona endémica para malaria y con altos niveles de desnutrición, se realizó un estudio de casos y controles con el objeto de determinar la relación entre el estado nutricional y la respuesta inmune humoral de niños con y sin malaria. Se trabajó con un grupo de 100 niños entre 4 y 9 años de edad, 51 con malaria y 49 sin ella, al cual se le determinaron los niveles de anticuerpos antimaláricos IgG e IgM por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), empleando antígenos de *P. falciparum* cepa FCB 2 mantenida en cultivo continuo. El estado nutricional se evaluó por comparación de las medidas antropométricas con la referencia de crecimiento del *National Center for Health Statistics (NCHS)* de los Estados Unidos. Los resultados mostraron diferencias en la tasa de positividad de anticuerpos IgG entre los niños maláricos y los no maláricos. En efecto: Veintinueve niños maláricos (56.9%) y sólo 4 de los no maláricos (8.2%) tenían dichos anticuerpos ($P < 0.00001$); la diferencia también fue significativa para el antecedente de malaria en el último año que fue de 70.6% en los niños maláricos y 10.2% en los no maláricos ($p < 0.00001$). Todas las determinaciones de IgM fueron negativas.

Por último, de los 29 seropositivos con malaria, 20 (69%) eran desnutridos ($p < 0.01$).

PALABRAS CLAVE

MALARIA
NUTRICIÓN
INMUNIDAD HUMORAL ANTIMALÁRICA

INTRODUCCIÓN

Por muchos años la malaria ha sido uno de los más grandes problemas mundiales de salud pública (1). Esta enfermedad pone en peligro la supervivencia de los niños, debilita la población activa y es un obstáculo importante en el desarrollo económico y social de los pueblos (2).

El 85% del territorio colombiano es endémico para malaria y el 72% de su población está en riesgo de enfermar (3). A pesar de los avances del conocimiento esta enfermedad sigue siendo un problema de salud pública porque la incidencia absoluta de casos ha aumentado en 1.406% en los últimos 34 años (1960-1994)(4).

DOCTORA SILVIA BLAIR, Médica, Jefe del Grupo de Malaria, Universidad de Antioquia; LICENCIADO LEONARDO ALBERTO RÍOS, Bacteriólogo, Especialista en Parasitología humana; LICENCIADA MARCELA ECHEVERRI, Auxiliar de Investigación; ISABEL POLANCO, Estudiante de Medicina; todos del Grupo Malaria, Universidad de Antioquia, Medellín Colombia.

Durante la infección malárica se producen anticuerpos de los tipos IgM e IgG (5) que pueden ser o no protectores; estos últimos se producen contra moléculas liberadas por el parásito o contra sus productos de degradación, no reaccionan con el parásito intacto ni participan en su eliminación. Los anticuerpos protectores, que corresponden sólo al 1% del total, están dirigidos contra diferentes estados de desarrollo del parásito como el esporozoito o el merozoito (6-9).

A través de la historia se ha observado una relación estrecha entre el estado nutricional y la susceptibilidad a las infecciones (10). En investigaciones realizadas por Christophers en 1911 y 1949, citado por McGregor (10), se pudo establecer cómo las epidemias de malaria y sus patrones de severidad y mortalidad en la población del noreste de India, eran consecuencia indirecta de la desnutrición, pues las deficiencias en la producción, provisión y distribución de alimentos coincidían con las epidemias (10). Sin embargo, otros autores afirman que la desnutrición protege de la malaria (11-14).

El objetivo de este trabajo fue establecer la relación entre la positividad de los anticuerpos antimaláricos de los tipos IgG e IgM y el estado nutricional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 49 niños y 51 niñas en edad escolar, entre 4 y 9 años, residentes en el municipio de El Bagre (Antioquia), divididos en dos grupos: Uno conformado por 51 niños maláricos, clínica y parasitológicamente, captados del puesto de diagnóstico de malaria del Hospital Regional. El otro, constituido por 49 niños no maláricos sin sintomatología y con gota gruesa negativa, procedentes en su mayoría del Barrio la Vega, sitio de invasión localizado en las afueras de la zona urbana del municipio, con transmisión intensa de malaria, y que comparte con el área rural del municipio casi todas las características epidemiológicas y de transmisión. Antes de realizar los exámenes de laboratorio, se dio a los padres o acudientes una ex-

plicación del trabajo y se solicitó su consentimiento escrito.

A cada niño se le hizo una encuesta que incluía identificación personal y aspectos epidemiológicos y clínicos y se le practicó un examen físico que permitiera descartar enfermedades diferentes a malaria.

Laboratorio

Diagnóstico parasitológico: Se realizaron gota gruesa y extendido delgado de sangre periférica.

Gota gruesa: Se tomó por punción capilar del dedo índice de la mano derecha y se coloreó con Romanowsky modificado; el recuento de parásitos se hizo con base en 300 leucocitos; la parasitemia se expresó en parásitos por μl de sangre.

Extendido delgado: Se coloreó con Giemsa; el recuento parasitario se realizó en 33 campos microscópicos y la parasitemia se expresó en porcentaje.

La parasitemia por μl se presentó en 4 niveles para facilitar su interpretación: <1.000 parásitos por μl , de 1.001 a 5.000, de 5.001 a 20.000 y > 20.001.

A cada niño se le extrajeron con Vacutainer 5 ml de sangre total sin anticoagulante; se separó el suero por centrifugación y se mantuvo rotulado y congelado a -70°C hasta su proceso por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Inmunofluorescencia indirecta

Se obtuvieron sueros controles positivos de pacientes que consultaron al Laboratorio de Hemoparásitos, con diagnóstico parasitológico positivo de malaria y un título conocido de anticuerpos. Los controles negativos fueron sueros de personas que nunca habían sufrido la enfermedad y cuyos títulos de anticuerpos eran negativos.

Se realizó la técnica indirecta de Hijmans (15) utilizando como antígeno esquizontes de *P. falciparum*, cepa FCB-2, obtenidos en el Laboratorio de Hemoparásitos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, a partir de un cultivo continuo de parásitos, sincronizado por el método del sorbitol, descrito por Lambros y Vanderberg

(16). Los esquizontes se purificaron mediante centrifugación a 17.000 rpm durante 30 minutos a 41°C, utilizando gradientes de Percoll. Con ellos, se preparó una suspensión de 1.000 parásitos/ μ l y de ésta se tomaron 20 μ l, que se depositaron en placas de vidrio para IFI y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron a cada pozo 10 μ l del suero problema y de los controles, en diluciones dobles, en solución *buffer* fosfatada (PBS); se partió de una dilución de 1:16 hasta 1:2.048. Se incubaron las placas a 37°C por 30 minutos, se lavaron dos veces con PBS y se les agregaron el anticuerpo anti IgG humana conjugado con isotiocianato de fluoresceína (BioMerieux) a una dilución 1:80 en PBS y Azul de Evans y el anticuerpo anti IgM humana conjugado con isotiocianato de fluoresceína (BioMerieux) a una dilución 1:50 en PBS y Azul de Evans; las placas se incubaron a 37°C por 30 minutos, se lavaron dos veces con PBS y una con agua destilada y se leyeron en un microscopio de fluorescencia marca Leitz. Se consideraron reactivos aquellos sueros que presentaron títulos por encima de 1:16 para IgG y 1:32 para IgM (9,17).

Evaluación del estado nutricional

El estado nutricional se estableció comparando las medidas antropométricas con la referencia de crecimiento recomendada por la OMS que es la del *National Center for Health Statistics (NCHS)* (18).

Para garantizar una buena medición se trabajó con una balanza marca Health O'meter previamente calibrada, con capacidad de 140 kilogramos y sensibilidad de 100 gramos. Para la medición de la talla se empleó un tallímetro con sensibilidad de un milímetro y numeración en centímetros, con pieza móvil superior para colocar sobre la cabeza y plantillas para la ubicación de los pies. Se capacitó a los investigadores para lograr uniformidad en los datos.

Los niños se pesaron dos veces descalzos, en ropa interior y el peso se registró en kilogramos con una cifra decimal; cada uno se midió descalzo, dos veces, siguiendo las indicaciones de la técnica.

Cada medida antropométrica fue interpretada por comparación con el valor promedio o mediana de

distribución de la población de referencia, usando una desviación standard (1 z-score) como unidad de medida.

Para el manejo de los datos se elaboraron los indicadores antropométricos: Peso para la edad (P/E) que hace referencia a la desnutrición global, talla para la edad (T/E) que se refiere a la desnutrición crónica y peso para la talla (P/T) que se refiere a la desnutrición aguda, a partir de puntajes Z y porcentajes de adecuación de nutrientes.

Análisis estadístico

Las diferencias en las variables continuas se analizaron con la prueba T de Student. Para las variables categóricas se utilizaron la prueba de Chi cuadrado y el contraste de proporciones.

RESULTADOS

Grupo de niños con malaria

Este grupo de 51 pacientes lo conformaron 26 hombres (51%) y 25 mujeres (49%) cuya edad media fue 6.8 años; la media de permanencia en la zona era 6.2 años. Treinta y seis niños (70.6%) habían sufrido entre 2 y 14 episodios de malaria en el último año (media =2).

En 34 (66.7%) la infección era por *Plasmodium vivax*, en 15 (29.4%) por *P. falciparum* y en 2 (3.9%) mixta.

Los niveles de parasitemia fluctuaron entre 22 y 26.107 parásitos por μ l de sangre; la media general de parasitemia fue 5.254 parásitos por μ l; la de *P. vivax* 5.495 y la de *P. falciparum* 3.820. En 21 niños (41.2%) la parasitemia estaba por debajo de 1.000 parásitos por μ l.

Ninguno de estos niños con malaria fue positivo para anticuerpos específicos de la clase IgM. Del total, 29 (56.9%) fueron seropositivos para IgG específica, con títulos que fluctuaron entre 1:16 y 1:8.192; el título más frecuentemente hallado fue 1:32.

Un 56.9% (29 casos) de los niños con malaria eran desnutridos y de los 29 seropositivos 20 (69%) también lo eran ($p < 0.01$).

Grupo de niños sin malaria

Este grupo de 49 individuos lo constituyeron 23

hombres (46.9%) y 26 mujeres (53.1%) cuya edad media era 7 años; la media de permanencia en la zona fue 6.5 años. Sólo 5 (10.2%) tenían antecedentes de episodios de malaria en el último año.

Ninguno de estos niños fue positivo para anticuerpos específicos de la clase IgM. Del total, 4 (8.2%) fueron seropositivos para IgG específica.

Un 67.3% (33 casos) de los niños del grupo sin malaria eran desnutridos y de los 4 seropositivos sólo 1 (25%) lo era ($p =$ no significativa).

Los dos grupos fueron similares en cuanto a edad, sexo, tiempo de permanencia en la zona y frecuencia de desnutrición. Se diferenciaron en la seropositividad (56.9% vs 8.2%; $p < 0.00001$) y los antecedentes de malaria en el último año, 70.6% vs 10.2% ($p < 0.00001$).

DISCUSIÓN

De acuerdo a los hallazgos el reto constante con los parásitos dado por los frecuentes episodios de malaria sería el estímulo requerido para generar la respuesta humoral. Sobre la insensibilidad de la IFI para IgM en la serología de la malaria, otros autores (19) han obtenido resultados semejantes.

Teniendo en cuenta la alta frecuencia de desnutrición (maláricos [56,9%] y no maláricos [67.3%]), y el observar que la mayor seropositividad de anticuerpos tipo IgG entre los maláricos se presentó en niños desnutridos (69%), se plantea la desnutrición como un factor estimulante de la respuesta inmune humoral. Sin embargo, el papel del estado nutricional en la presencia o no de malaria no fue claro dado que no se presentaron diferencias según este criterio, además de la mayor seropositividad en los maláricos desnutridos que en los no maláricos desnutridos; estos hallazgos son consistentes con trabajos que hablan acerca de una alteración mayor de la respuesta inmune celular que de la humoral en los individuos con malaria (20).

SUMMARY

ANTIMALARIC ANTIBODIES IN SCHOOL CHILDREN IN EL BAGRE, COLOMBIA

A cases and controls study was carried out in 1996 in El Bagre, Colombia, endemic zone for malaria, in order to determine the relationship between nutritional situation and immune response to malaria in 51 children with malaria and 49 without it; IgG and IgM antibodies were determined by means of indirect immunofluorescence against *P. falciparum* antigens (Strain FCB2). Nutritional situation was evaluated according to *USA National Center for Health Statistics*.

No child was found positive for IGM antibodies; concerning IgG response, it was positive in 29 (56.9%) malaric children but only in 4 (8.2%) of the non-malaric ones ($p < 0.00001$). Difference was also significant ($p < 0.00001$) for malaria antecedents in the previous year (70.6% in malaric children vs 10.2% in the nonmalaric ones). Of the 29 malaric seropositive children 20 (69%) were malnourished ($p < 0.01$).

BIBLIOGRAFÍA

1. BOTERO D, RESTREPO M. Parasitosis Humanas. 2da ed. Bogotá: Presencia, 1992: 144-190.
2. A rapi dipstick antigen capture assay for the diagnosis of falciparum malaria: WHO informal consultation on recent advances in the diagnostic techniques and vaccines for malaria: *Bulletin WHO* 1996;74:47-54.
3. RODRÍGUEZ M, MORALES LG. La malaria y su relación con aspectos socio-culturales, Cáceres-Antioquia, 1997. En Servicio Seccional de Salud de Antioquia. Boletín Epidemiológico de Antioquia. Medellín 1989; 14: 77-83.
4. Ministerio de Salud, Unidad Administrativa Especial de Campañas Directas. División Técnica. Plan Nacional de Prevención y Control de la Malaria. Bogotá 1995;74.
5. AGYEPONG IA. Women and malaria: Social, economic, cultural, and behavioral determinants of malaria. En: WIJEYARATNE P, RATHGEBER EM, ST-ONGE E. Women and Tropical Diseases. Ottawa: IDRC, 1992; 176-191.
6. COHEN S, DEANS JA. Specific acquired immunity in experimental malaria. En: WERNSDORFER WH, Mc GREGOR SI. Eds. Malaria: Principles and Practice of Malariology. Gran Bretaña: Churchill Livingstone, 1988: 1: 515-557.
7. BLAIR S, CORREA A, CARMONA J, et al. Malaria, inmunidad y nutrición: Estudio piloto en escolares de la zona urbana del municipio de El Bagre-Antioquia. Medellín 1994-1995; 111.

8. RAMÍREZ H. Situación en salud del niño colombiano. En: Servicio Seccional de Salud de Antioquia. Boletín epidemiológico de Antioquia. Medellín 1992; 17: 90-97.
9. FERREIRA AW. Inmunodiagnóstico de la malaria. En: LÓPEZ ANTUÑANO FJ, SCHMUNIS G, Eds. Diagnóstico de la malaria. Publicación Científica N° 512. OPS. Washington 1988: 65-75.
10. Mc GREGOR SI. Malaria and Nutrition. En: WERNSDORFER WH, Mc GREGOR SI. Eds. Malaria. Principles and Practice of Malariology. Gran Bretaña: Churchill Livingstone, 1988:1:753-767.
11. EDIRISINGHE JS, FERN EB, TARGETT GA. The influence of dietary protein on the development of malaria. *Ann Trop Paediatr* 1981; 1: 87-91.
12. DUNCAN A. Putative pathophysiological interactions of citokines and phagocytic cells in severe human falciparum malaria. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 117-131.
13. HEYWOOD A, OPPENHEIMER S, HEYWOOD P, JOLLEY D. Behavioral effects of iron supplementation in infants in Madang, Papua New Guinea. *Am J Clin Nutr* 1989; 50 (suppl 3): 630-637.
14. AREMU CY. Changes in serum transferrin and iron concentrations in humans suffering from malaria with parasitemia. *Ann Trop Med Parasitol* 1989; 83: 517-520.
15. HIJMANS, SCHMIT HRE, JONGSMA APM, PLOEM JS. Performance testing of fluorescent antisera against human immunoglobulins. En: HOLBOSOW Ej, ed. Standardization in immunofluorescence. Oxford: Blackwell scientific publications 1970: 193-202.
16. LAMBROS C, VANDENBERG J. Sincronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979 ; 65: 418-420.
17. RAMSEY JM. Técnicas de laboratorio. En: LÓPEZ ANTUÑANO FJ, SCHMUNIS G. Eds. Diagnóstico de la malaria. Publicación Científica N°512. OPS, Washington 1988: 76-78.
18. GARZA C, YIP R, VICTORIA CG, OWIS M de. Report of the subcommittee for infants and children of the WHO expert committee on physical status: The use and interpretation of anthropometry. Geneva: World Health Organization 1993: 65.
19. CORNILLE-BRÖGGER R, MATHEWS HM, STOREY J, et al. Changing patterns in the humoral immune response to control measures: A longitudinal study in the West African savanna. *Bull WHO* 1978; 56: 579-600.
20. STIEHM ER. Humoral immunity in malnutrition. *Federation Proc* 1980; 39: 3093-3097.
-