

TOXOPLASMOSE AGUDA: AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOENSAIO EM CAMADA DELGADA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM, ANTI-TOXOPLASMA GONDII

Henry Inácio ZANEVAN REQUEJO, Tokiko KYOMEN MATSUMOTO, Massami KAWARABAYASHI, Paulo Mutuko NAKAMURA, Waldemar EBNER FILHO & José de Jesus Chaves NUNES.

RESUMO

Um método de reação antígeno-anticorpo denominado IMUNOENSAIO EM CAMADA DELGADA (ICD) foi padronizado e avaliado para o imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda, através da detecção de anticorpos IgM, anti-*Toxoplasma gondii* (ICD-IgM). Um total de 300 amostras de soros, tendo ou não o perfil sorológico da toxoplasmose aguda, foi estudado pelo ICD-IgM e os resultados analisados quanto aos aspectos qualitativos e quantitativos em relação aos testes convencionais de imunofluorescência indireta para a detecção de IgM, (IFI-IgM) e de hemaglutinação pré e após tratamento com 2-mercaptoetanol (HA-2ME). Foram calculados os coeficientes de correlação entre os resultados fornecidos pelo ICD-IgM e as técnicas convencionais, de acordo com as concentrações do antígeno, assim como, foi verificada a influência dessas concentrações antigênicas nos índices relativos de sensibilidade e de especificidade. O estudo estatístico mostrou reprodutibilidades significativas dos resultados inter e intra testes, assim como no reaproveitamento do antígeno por 10 vezes. Os resultados de ICD-IgM mostraram que as concentrações antigênicas ideais foram de 70 a 100 µg/ml, para o ensaio em questão, para se obter máximas sensibilidade e especificidade. Portanto, ICD-IgM, por fornecer resultados tão sensíveis e específicos quanto aqueles dos testes convencionais referidos, poderá ser empregado para fins diagnósticos.

UNITERMOS: Toxoplasmose aguda; Imunodiagnóstico; Anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

INTRODUÇÃO

Para a prevenção de graves manifestações tardias que a toxoplasmose congênita e a toxoplasmose adquirida do recém-nascido pode produzir¹, o diagnóstico precoce dessa infecção quer seja em mulheres grávidas como nos recém-nascidos e nos imunodeficientes, é de importância primordial. Desta forma, o desenvolvimento de novas técnicas sorodiagnósticas alternativas àquelas atualmente existentes, de baixo custo e de execução simples, tendo altas sensibilidade e especifici-

dade, seria de auxílio inestimável.

Em 1976, ELWING et alii² descreveram um imunoenensaio em camada delgada (ICD), de execução simples, para a demonstração da reação antígeno-anticorpo. O ensaio foi apresentado como sendo uma técnica de difusão em gel modificada, onde na fase sólida, o antígeno é imobilizado antes de ser recoberto com uma camada fina de gel de ágar. E, nos orifícios feitos em gel, os soros dos pacientes são adicionados para difundir. Após a formação da imunoprecipitação radial, o gel é removido e a fase sólida é tratada com um

soro imune contra o anticorpo do paciente. A visualização da reação se faz através da exposição da fase sólida sobre o vapor d'água de um banho-maria a 56°C e os resultados são obtidos medindo-se o diâmetro da zona de condensação hidrofílica^{2,6,9}.

No presente trabalho, ICD-IgM foi padronizado para a detecção de anticorpos IgM e avaliado para o imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda em relação aos testes convencionais de imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos IgM (IFI-IgM) e, de hemaglutinação para soros tratados com 2-mercaptoctanol (HA-2ME).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de soros

Foi estudado um total de 300 amostras de soros, sendo 150 reagentes e 150 não reagentes nos testes convencionais de triagem da toxoplasmose aguda, IFI-IgM e HA-2ME como descritos por CAMARGO & LESER¹, empregando-se em IFI-IgM taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, obtidos em exsudato peritoneal de camundongos infectados juntamente com células tumorais T-180 e formolizados; e, para HA-2ME, extrato salino de taquizoítos obtidos da mesma forma e ultra-sonicados.

Preparo do antígeno

Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* cepa RH, foram obtidos em exsudato peritoneal de 20 camundongos infectados durante 72 horas, juntamente com células tumorais TG-180. O exsudato foi lavado duas vezes com solução fisiológica de NaCl 0,15 M, sob centrifugação de 2.500 rpm por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 5 ml de água destilada e sonicado 4 x 1,5 A por 30 segundos¹². Em seguida juntou-se à suspensão sonicada, solução salina NaCl 0,15 M (v/v). Nova centrifugação foi feita, a 12.000 rpm por 30 minutos e foi colhido o sobrenadante, denominado então de antígeno solúvel. A concentração protéica desse antígeno solúvel, determinada pelo método de LOWRY et alii⁷, foi de 72 mg%. Empregou-se como padrão na dosagem protéica, a albumina bovina fração V (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA).

ICD-IgM

Na padronização de ICD-IgM, o antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* preparado como acima descrito, foi ensaiado em diferentes concentrações, a partir de 100 mg/ml até 2,25 µg/ml, para a sensibilização das placas de Petri transparentes, de poliestireno, previamente lavadas com etanol a 95% e com solução fisiológica. Em cada placa foram adicionados 20 ml do antígeno previamente diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M de pH 9,6 (STCB). A seguir procedeu-se uma incubação durante 1 hora a temperatura ambiente. O antígeno foi então removido e reutilizado para a sensibilização posterior de 10 novas placas, desde que em estudo estatístico prévio mais adiante referido, a reprodutibilidade dos resultados foi verificada. A superfície das placas foi lavada com água destilada e, enquanto úmida, 15 ml de ágar a 1% fundido contendo 1% de soro normal de cavalo, foram adicionados de modo a se obter uma fina camada de gel, de 2,5 mm de espessura. Após a gelificação do ágar, 10 orifícios de 3 mm de diâmetro foram feitos e preenchidos com os soros de pacientes. A camada de gel foi removida após a placa ter sido incubada por 48 horas a temperatura ambiente. Efetuaram-se então três lavagens em água destilada, durante 30 minutos, sob agitação constante. Adicionou-se depois o soro anti-IgM humano (concentração protéica igual a 34 mg%) diluído a 1:200 em solução salina tamponada com fosfatos de pH 7,2 (SSTF) e incubou-se por mais 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas como mencionado e secas com jato de ar quente. Os diâmetros de imunoprecipitação radial foram expressos em milímetros, correspondentes à área de condensação de vapor d'água, formada durante a exposição da superfície interna da placa ao vapor de um banho-maria a 56°C. Os diâmetros positivos contrastaram-se dos negativos pelo tamanho maior das zonas circulares hidrofílicas de condensação de vapor d'água.

Após a leitura dos diâmetros, as placas puderam ser recuperadas para reutilizações posteriores. Para a recuperação das placas, estas foram tratadas com NaOH 6N durante 18 horas a temperatura ambiente, seguido de um novo tratamento com HCl 6N nas mesmas condições, e então lavadas e secas.

Análise estatística

Para a avaliação de ICD-IgM foram calculados os índices relativos de sensibilidade, especificidade e eficiência, os valores preditivos e o índice K (Kappa)^{3,4} de concordância em relação aos títulos correspondentes nas técnicas convencionais IFI e HA-2ME. Calculou-se ainda os coeficientes de correlação⁸ r_1 e r_2 obtidos entre os diâmetros de imunoprecipitação radial e os respectivos títulos de IFI-IgM e de HA-2ME, com limites de confiança de 95%. As equações das retas de regressão ($Y = A + BX$) foram também determinadas no estudo das correlações entre os diâmetros fornecidos por ICD-IgM e os títulos de IFI-IgM, assim como os mesmos diâmetros e os títulos de HA-2ME⁸. Para tanto, os títulos (T) de anticorpos foram codificados (T_c) conforme $T_c = \log_2 T$, sendo T correspondente ao título do teste tomado como referência, ou seja, a recíproca da maior diluição do soro ainda com reatividade ($T = 1/D$). Os títulos de HA-2ME corresponderam à diferença que ocorreu entre os títulos antes e após o tratamento com 2-mercaptoetanol. O limiar de reatividade foi calculado em função de $x + 2s$, onde x correspondeu à média aritmética dos diâmetros obtidos com as amostras negativas e s, o desvio padrão⁵ calculado sobre essas mesmas amostras.

Para a obtenção de maior rendimento de uma mesma partida de antígeno de *T. gondii*, 10 placas foram consecutivamente sensibilizadas com o mesmo antígeno e ensaiadas contra soros padrão positivo e negativo. Os resultados foram avaliados em termos de média aritmética dos diâmetros e respectivos valores de desvio padrão e comparados com os dados de reprodutibilidade intra e inter testes. A determinação da reprodutibilidade intra-teste foi feita com 25 ensaios de ICD-IgM no mesmo dia estimando-se valores de x e s para os soros padrão positivo e negativo. A reprodutibilidade inter-teste foi efetuada com os testes realizados em 5 dias diferentes, contra soros padrão e igualmente calculados os valores de x e s. Para os estudos de reprodutibilidade, o teste estatístico t de Student⁵ foi aplicado, com significância a nível de 95%.

RESULTADOS

A análise dos resultados obtidos no presente trabalho revelou que ICD-IgM apresenta características satisfatórias quando comparado com os

testes convencionais IFI-IgM e HA-2ME, tomados como referência. A Tabela 1 mostra que ICD-IgM teve melhor desempenho nas concentrações de 72 mg/ml e 100 mg/ml, em virtude dos valores máximos obtidos para sensibilidade, especificidade e eficiência. Os valores preditivos de resultados positivos e negativos foram igualmente melhores nessas concentrações. Nas concentrações mais baixas, os índices avaliadores em geral (fig. 1) tiveram decréscimos em seus valores, com a exceção da especificidade e do valor preditivo positivo que se mantiveram inalterados até a concentração de 4,5 mg/ml. Os valores dos índices K de concordância também acompanharam paralelamente os demais índices, ou seja, de valor igual a 1,00 para as duas concentrações mais altas e decrescendo gradualmente à medida que diminuiu a concentração do antígeno. A análise da reprodutibilidade dos resultados determinou o emprego da mesma partida de antígeno para o mínimo de 10 vezes, tendo-se obtido para os testes, $x = 16$ mm ($s = 1,8$) para soros positivos e $x = 4,5$ mm ($s = 1,0$) para soros negativos. No estudo das reprodutibilidades inter e intra-testes foram obtidos os valores $x = 17$ mm ($s = 0,7$) para soro padrão positivo e $x = 5$ mm ($s = 1,5$) para o soro padrão negativo. O teste t de Student indicou que não houve diferença significativa em relação aos valores tomados como referência (t obtido = 1,351 e t crítico $0,05 = 1,711$ para g.l. = 24).

Os coeficientes de correlação calculados com limites de confiança de 95%, foram mais

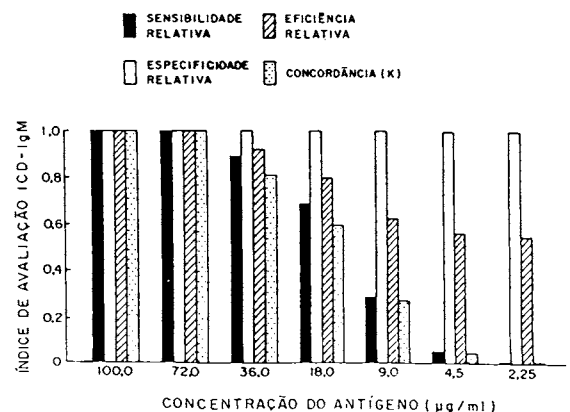


Fig. 1: Toxoplasmose aguda – índices de avaliação obtidos para ICD-IgM, de acordo com as concentrações do antígeno de *T. gondii*.

TABELA 1

Índices avaliadores para ICD-IgM no diagnóstico da toxoplasmose aguda, conforme as diversas concentrações do antígeno de *T. gondii* empregada, em relação aos testes convencionais associados, IFI-IgM e HIA-2ME

Concentração do antígeno	Sensibilidade relativa	Especificidade relativa	Eficiência relativa	+PV	-PV	k	r ₁	r ₂
100,00	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,7263	0,8863
72,00	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,7227	0,8579
36,00	0,8960	1,0000	0,9206	1,0000	0,7500	0,8036	0,7187	0,8513
18,00	0,6875	1,0000	0,7945	1,0000	0,6250	0,6011	0,6957	0,8274
9,00	0,2847	1,0000	0,6282	1,0000	0,5635	0,2766	0,5719	0,7315
4,50	0,0417	1,0000	0,5577	1,0000	0,5490	0,0447	0,2946	0,3840
2,25	0,0000	1,0000	0,5472	0,0000	0,5472	0,0000	0,0000	0,0000

(*) +PV = valor preditivo positivo; -PV = valor preditivo negativo; k (kappa) = coeficiente de concordância; r₁ = coeficiente de correlação entre ICD-IgM e IFI-IgM (P < 0,005); r₂ = coeficiente de correlação entre ICD-IgM e HA-2ME (P < 0,005).

altos para as concentrações de 72 a 100 mg/ml (fig. 2 e 3). O teste t de Student mostrou significância estatística quanto à existência de linearidade em todas as retas de regressão obtidas, isto é, os valores obtidos para t foram todos maiores do que 3,579 sendo o valor de t crítico igual a 2,576 a nível de 5%, para g.l. igual a 299.

Os diâmetros de ICD-IgM obtidos para as zonas de imunoprecipitação radial apresentaram uma variação de 6 a 20 mm para as amostras de soros positivos (x = 12 mm). Os títulos de IFI-IgM de 16 a 256 (y = 70) se correlacionaram com os diâmetros de 6 a 12 mm (x = 8 mm) enquanto que os títulos maiores, de 512 a 8.000 (y = 560) tiveram correspondência com os diâmetros de 10 a 20 mm (x = 16 mm). Para 100 mg/ml de concentração antigênica o limiar de reatividade registrado foi de 8 mm enquanto que para a de 72 mg/ml esse valor ficou ao redor de 5 mm. Para as demais concentrações as médias dos diâmetros foram se reduzindo até atingir o valor zero, sendo possível somente se detectar anticorpos quando estes estão presentes em grande quantidade, com títulos T acima de 256 para IFI ou HAP.

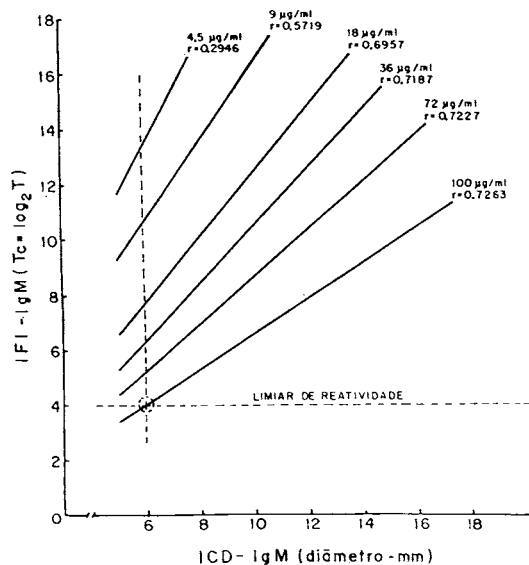
A queda dos títulos de HAP após o tratamento dos soros com 2-mercaptoetanol foi bastante significativa, de modo que os títulos positivos de 16 a 8.000 (y = 256) caíram para os valores de 0 a 128 em HA-2ME (y = 16), valores esses correlacionados aos diâmetros positivos de ICD-IgM, mostrando que ICD-IgM foi específico para

a detecção de anticorpos IgM anti-Toxoplasma gondii (fig. 3).

DISCUSSÃO

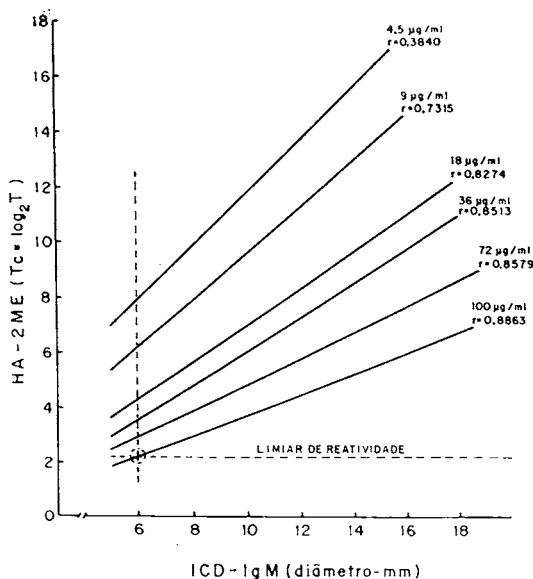
A técnica ICD-IgM avaliada no presente trabalho, desenvolvida inicialmente por ELWING et alii para a detecção de anticorpos, é sem dúvida um método simples e confiável baseado no princípio de que os antígenos são macromoléculas que podem ser absorvidas como uma fina camada na superfície de poliestireno e então essas moléculas com reatividade sorológica, são capazes de se ligar a anticorpos. A presença de anticorpos na superfície antigênica é visualizada quando se forma uma condensação hidrofílica durante a exposição do sistema ao vapor d'água de um banho-maria a 56°C^{2,6}. A técnica ICD pode ser empregada tanto para pesquisas de IgG quanto de IgM¹¹ utilizando-se portanto soros imunes de animais anti-IgG ou anti-IgM humano para possibilitar a revelação dos halos de imunoprecipitação radial.

Desde que este imunoenensaio não foi ainda aplicado para o imunodiagnóstico de toxoplasmose aguda, procedemos aqui a um estudo referente a influência da concentração antigênica sobre os índices relativos de sensibilidade e de especificidade. A pesquisa demonstrou ter ICD-IgM a mesma eficiência diagnóstica dos testes sorológi-



Concentração do antígeno (µg/ml)	Equação da reta de regressão
100	$Y=0,2376+0,6387X$
72	$Y=0,1409+0,8502X$
36	$Y=0,0623+1,0469X$
18	$Y=0,7391+1,1779X$
9	$Y=2,2281+1,4145X$
4,5	$Y=3,7117+1,5957X$

Fig. 2: Coeficientes de correlação e respectivas retas de regressão obtidas entre os diâmetros de ICD-IgM e os títulos de IFI-IgM, de acordo com as diferentes concentrações de antígeno.



Concentração do antígeno (µg/ml)	Equação da reta de regressão
100	$Y=0,2044+0,3482X$
72	$Y=0,1237+0,4695X$
36	$Y=0,0059+0,6005X$
18	$Y=0,4511+0,6515X$
9	$Y=1,1966+0,8414X$
4,5	$Y=2,0746+0,9674X$

Fig. 3: Coeficientes de correlação e respectivas retas de regressão obtidas entre os diâmetros de ICD-IgM e os títulos de HA-2ME, de acordo com as diferentes concentrações de antígeno.

cos convencionais IFI-IgM e HA-2ME, empregados na rotina laboratorial para diagnóstico da toxoplasmose aguda.

Em outros sistemas antigênicos, como por exemplo o de *Campilobacter jejuni*¹¹, antígenos purificados foram empregados nas concentrações de 25 mg/ml para aqueles de natureza glicoprotéica e de 20 mg/ml para os de natureza lipopolissacarídica, e obteve-se em relação a outras reações convencionais, coeficientes de correlação satisfatórios, r igual a 0,88 para pesquisa de anticorpos IgG e r igual a 0,85 para IgM. Nesse sistema, os diâmetros de imunoprecipitação radial correspondentes a limiar de reatividade ficaram em torno de 6 mm para IgG e 5 mm para IgM. Com o emprego de ICD para a detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, NILSSON & VOLLER

usaram um antígeno de concentração protéica não definida⁹ e encontraram os valores positivos para soros chagásicos com o limiar de reatividade em torno de 9 mm. Para a concentração de 100 mg/ml de antígeno de cercárias de *Schistosoma mansoni*¹⁰ foi determinado o limiar de reatividade de 5 mm como de diagnóstico positivo. Diâmetros de 6 mm foram considerados como limiar de reatividade na pesquisa de anticorpos contra Virus Herpes Simplex⁶ usando-se antígeno glicoprotéico de 100 mg/ml.

Em nosso estudo, utilizando-se antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* preparado em STCB pH 9,6 encontramos para a concentração de 72 mg/ml, o limiar de reatividade em torno de 5 mm e para a de 100 mg/ml o limiar de reatividade ficou em torno de 8 mm, em relação aos títulos

de IFI-IgM e de HA-2ME. Provavelmente, as concentrações de antígenos nos diversos sistemas analisados, variam em função principalmente das cargas eletrostáticas encontradas nas moléculas antigênicas, do que propriamente na sua natureza química protéica, glicoprotéica, etc. Analogamente ao que ocorre na imunodifusão radial, a área de difusão dos soros de pacientes com a toxoplasmose aguda, no ICD-IgM, correlaciona-se com o teor de anticorpos específicos presentes.

Para a concentração antigênica de 100 µg/ml foram obtidos os coeficientes de correlação mais altos quando se comparou os diâmetros de reação ICD-IgM com os títulos de IFI-IgM ($r_1 = 0,7263$) e os mesmos diâmetros, com os títulos de HA-2ME ($r_2 = 0,8863$). Esses coeficientes foram decrescendo conforme se diminuiu a concentração do antígeno.

Comparados aos títulos de IFI-IgM e de HA-2ME, os valores obtidos em ICD-IgM mostraram um aumento crescente dos diâmetros, diretamente proporcional a concentração do anticorpo no soro testado e também a concentração de antígeno absorvido na superfície de poliestireno, isto é, dado um soro padrão de referência e uma concentração definida de antígeno, a quantidade de anticorpos nos soros de pacientes pode ser estimada diretamente, a partir do diâmetro da reação ICD-IgM.

Parece-nos portanto que ICD-IgM pode ser considerado como um teste alternativo aos atualmente existentes, para se efetuar o imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda, devido a sua reprodutibilidade, principalmente em laboratórios que dispõem de facilidade de biotério.

SUMMARY

ACUTE TOXOPLASMOSIS: EVALUATION OF THE THIN-LAYER IMMUNOASSAY FOR DETECTING IgM ANTIBODIES TO TOXOPLASMA GONDII.

A solid phase method, thin-layer immunoassay (IgM-TIA) was standardized and evaluated for the immunodiagnosis of acute toxoplasmosis, through the detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*. A total of 300 serum samples from serologically defined acute toxoplasmosis and, from non-related infections, was investigated by IgM-TIA. Statistical analysis were carried out in

comparison with conventional tests, the immunofluorescence test for the detection of IgM antibodies (IgM-IFI) and hemagglutination test which uses 2-mercaptoctanol serum treatment (2ME-HA).

Also the correlation coefficients were calculated for various *Toxoplasma gondii* antigen concentrations, as well as, the influence of the antigenic concentration on the relative indices of sensitivity and specificity were verified. The intra and inter test reproducibilities were demonstrated statistically, as well as, the reutilization of *T. gondii* antigen was proven to be possible for at least 10 times.

The data indicated that antigenic concentrations, from 70 to 100 µg/ml, were able to provide maximum sensitivity and specificity. IgM-TIA displayed similar diagnostic efficiency to those two conventional tests here utilized, and may be employed to make diagnosis of acute toxoplasmosis, mainly if laboratory animals are available.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Sumie Hoshino-Shimizu, pela colaboração na análise e avaliação do presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMARGO, M.E. & LESER, P.G. - Diagnosis information from serological tests in human toxoplasmosis. II. Evolutionary study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence tests. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 18:227-238, 1976.
2. ELWING, H.; NILSSON, L.A. & OUCHTERLONY, O. - Visualization principles in thin-layer immunoassay (TIA) on plastic surfaces. Int. Arch. Allergy, 51:757-762, 1976.
3. FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W. & WAGNER, E.H. - Clinical epidemiology - the essentials. Baltimore, Waverly Press, 1983.
4. FEINSTEIN, A.R. - Clinical epidemiology. The architecture of clinical research. Philadelphia, W.B. Saunders, 1985. p.185-186.
5. HINCHEN, J.D. - Practical statistics for chemical research. London, Ed. Methuen & Co., 1969.
6. JEANSSON, S.; ELWING, H. & NILSSON, L.A. - Thin-layer immunoassay for determination of antibodies to Herpes Simplex Virus. J. clin. Microbiol., 9:317-322, 1979.

7. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. – Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
8. LUTZ, W. – Statistical methods as applied to immunological data. In: Handbook of experimental Immunology. 3rd. ed. Oxford, Blackwell, 1978. p.A2.1.
9. NILSSON, L.A. & VOLLEK, A. – A comparison of thin-layer immunoassay (TIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 76:95-97, 1982.
10. NILSSON, L.A.; BJORCK, L. & OUCHTERLONY, O. – Paper discs impregnated with capillary blood. A sampling technique for immunoassays by means of DIG-ELISA and DIG-TIA. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 79:314-318, 1985.
11. SVEDHEM, A.; GUNNARSSON, H. & KAJSER, B. – Diffusion-in-gel enzyme-linked immunosorbent assay for routine detection of IgG and IgM antibodies to *Campylobacter jejuni*. *J. infect. Dis.*, 148:82-92, 1983.
12. TURUNEN, H.J. – Detection of soluble antigen of *Toxoplasma gondii* by a four-layer modification of an enzyme immunoassay. *J. clin. Microbiol.*, 17:768-773, 1983.

Recebido para publicação em 31/5/1989.