

## AVIDEZ DE ANTICORPOS IgG ESPECÍFICOS COMO MARCADORES DE INFECÇÃO PRIMÁRIA RECENTE PELO *TOXOPLASMA GONDII*

Mário E. CAMARGO (1,2), Sueli M. da SILVA (2), Paulo G. LESER (1) & Celso H. GRANATO (1).

### RESUMO

A caracterização de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii* se apoia principalmente na presença, no soro, de anticorpos específicos IgM. Para fins diagnósticos de toxoplasmose aguda, ou de contágio recente, a possibilidade de outros marcadores é altamente desejável. Um marcador de infecção recente atualmente referido é a baixa afinidade ou avides de anticorpos específicos IgG.

Para avaliação do novo marcador, titularam-se os soros contra poliantígenos do *T. gondii* pelo teste imunoenzimático (ELISA), antes e após tratamento dos complexos antígeno-anticorpo formados, com solução de ureia 6 M como agente dissociante. O deslocamento de anticorpos de baixa avides foi indicado por uma queda de títulos, calculada em porcentagem em relação aos títulos iniciais. Foram estudados 69 soros, 23 de cada um dos 3 perfis sorológicos sucessivos, observados na infecção, e que a caracterizam respectivamente como recente, em fase de transição e crônica. Os perfis foram determinados segundo os resultados de uma bateria de testes, incluindo os de imunofluorescência IgG e IgM, de captura de anticorpos IgM e de hemaglutinação. Para os soros de infecção crônica a queda observada foi de  $3\% \pm 3\%$ , de  $34\% \pm 12\%$  para toxoplasmose recente e de  $12\% \pm 9\%$  para a fase de transição. Conclui-se que a determinação da avides de anticorpos IgG pode ser utilizada como marcador de infecção primária recente pelo *T. gondii*.

**UNITERMOS:** *Toxoplasma gondii*; Infecção primária; IgG.

### INTRODUÇÃO

A infecção toxoplásmica está presente em elevada porcentagem de indivíduos da população, em geral sob forma crônica ou pregressa. Ela é evidenciada por anticorpos séricos, específicos para componentes antigênicos do toxoplasma, geralmente em títulos baixos. Os casos de toxoplasmose aguda podem ser identificados por meio de marcadores sorológicos que, na verdade, são indicadores de uma infecção recente. O mais característico desses marcadores é a presença de anticorpos IgM anti-toxoplasma. Outros tem sido referidos, como anticorpos IgG de títulos altos ou em

rápida elevação, ou diferencial significativo entre títulos altos do teste de imunofluorescência para anticorpos IgG e títulos baixos do teste de hemaglutinação. De acordo com tais marcadores, é possível distinguir três perfis sorológicos sucessivos no curso da infecção toxoplásmica, correspondentes respectivamente às fases aguda, de transição e crônica<sup>1,2</sup>. Um novo marcador sorológico tem sido reconhecido, capaz de distinguir entre infecções recentes e infecções antigas, que diz respeito à avides dos anticorpos IgG específicos. Nas infecções recentes uma alta porcentagem desses anticor-

(1) Laboratório Fleury de Análises Clínicas. São Paulo, SP, Brasil

(2) Biolab Diagnóstica S/A. São Paulo, SP, Brasil

Endereço para correspondência: Dr. Mário E. Camargo. Laboratório Fleury de Análises Clínicas. Rua Cincinato Braga, 282. CEP 01333 São Paulo, SP, Brasil

pos mostra baixa avidéz, isto é, baixa afinidade para os antígenos correspondentes. Durante semanas ou meses, esses anticorpos vão apresentando avidéz crescente, de modo que nas infecções de mais longa duração encontra-se um predomínio marcante de anticorpos de grande afinidade<sup>9</sup>.

Para avaliação da avidéz, uma técnica simples foi descrita<sup>7,8</sup>, baseada na maior ou menor facilidade com que esses anticorpos são dissociados de complexos com os antígenos específicos. Essa dissociação resulta da ação de agentes desnaturantes de proteínas ou desestabilizantes de ligações de pontes de hidrogênio, tais como soluções de dietilamina, cloridrato de guanidina, uréia e outros. Para esse fim, em testes imunoenzimáticos (ELISA) com antígenos fixados em placas plásticas, determinou-se a reatividade de anticorpos IgG antes e após lavagem dos complexos imunes formados, com solução de um desses agentes. Nas infecções recentes observa-se acentuada queda da reatividade das reações submetidas ao agente dissociante, enquanto que nas infecções antigas há, no máximo, discreta diminuição.

Nesta publicação são apresentados os resultados referentes à determinação da avidéz em soros de infecções toxoplásmicas com diferentes perfis sorológicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Teste Imunoenzimático ELISA para Anticorpos IgG Anti-Toxoplasma**- O teste foi realizado em placas com cavidades de fundo plano ("medium binding" NUNC, Dinamarca), sensibilizadas com extrato antigênico de toxoplasmas. Estes parasitas foram obtidos por lavagem, com solução salina tamponada com fosfatos, da cavidade peritoneal de camundongos após 2 dias de inoculados. A suspensão foi purificada por filtração em algodão de nylon e os parasitas lisados por ultrassom por 5 ou 6 períodos de 1 minuto, a 4°C (Sonifier cell disruptor, Heat Systems - Ultrasonic, N.Y., USA). Após centrifugação, utilizou-se o sobrenadante como antígeno. As placas foram sensibilizadas por incubação a 4°C por 18 a 24 horas, com 100µl de solução antigênica por cavidade, na concentração protéica de 4 µg/ml em PBS pH 7,2 (NaCl 0,15M, fosfatos 0,01M). Depois de lavadas, as placas foram bloqueadas por incubação a 37°C por 1 hora com 100µl por cavidade de PBS contendo 2% de extrato de soja (PBSS) e lavadas novamente com PBSS. Para o teste, incubaram-se as

placas por 1 hora com 100µl, sucessivamente, de diluições de soros e de conjugado anti-IgG humana-peroxidase (Biolab Diagnóstica S/A), em PBSS. Ambas as incubações foram seguidas de lavagens das placas em PBSS ou como adiante referido, por 3 períodos de 5 minutos cada. Procedeu-se à reação de coloração por 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, com 100µl de solução cromógena de peróxido de hidrogênio e ortofenilenodiamina, interrompida pela adição de 25µl de solução 2M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura foi feita em 490nm, em espectrofotômetro para placas.

**Testes de Avidéz de Anticorpos IgG Anti-Toxoplasma** - As diluições dos soros foram ensaiadas em duplicatas. As lavagens das placas, após a fase de incubação com o soro, foram feitas, para uma das séries de diluições, com PBSS, nos três períodos sucessivos de 5 minutos cada. Para a outra série, a primeira lavagem foi feita com solução 6M de uréia em PBSS, seguindo-se as duas lavagens em PBSS.

A diferença entre os títulos observados na 2ª série (T.U), com relação aos da 1ª série (T), foi expressa em porcentagem de queda (Q%):

$$Q\% = 100 - \frac{TU \times 100}{T}$$

Para simplificar, os cálculos puderam ser feitos a partir das absorvâncias correspondentes, tomando-se os valores em densidades ópticas respectivas, em lugar de títulos.

**Outros testes** - Os testes de imunofluorescência anti IgG (IF-IgG) e anti IgM (IF-IgM), foram realizados com antígenos de toxoplasma (Imunotoxo, Biolab Diagnóstica S/A) e conjugados fluorescentes específicos respectivamente para cadeias  $\gamma$  e  $\mu$  (Fluolines G e M, Biolab Diagnóstica S/A). Os resultados do teste IF - IgG foram expressos em títulos (T) ou convertidos em unidades internacionais (U.I) com referência ao Soro Padrão para Toxoplasmose, da Organização Mundial de Saúde<sup>4</sup>, obtendo-se, como fator de conversão o valor de 0,15 (U.I = T x 0,15). Para evitar interferências nos resultados, procedeu-se aos testes IF - IgM após a remoção das IgG das amostras por precipitação com anticorpos anti - IgG (reagente RF Absorbent, Behring). Para o teste imunoenzimático de captura de IgM utilizaram-se placas plásticas sensibilizadas com um anticorpo monoclonal anti-IgM produzido no Laboratório. Intercaladas por la-

vagens, as placas foram incubadas sucessivamente com diluições dos soros, de antígeno de toxoplasma e do conjugado anti-toxoplasma, constituído pela fração F (ab<sup>1</sup>)<sub>2</sub> de IgG obtida em coelho, marcada pela peroxidase. O teste de hemaglutinação foi realizado com o reagente Hematoxo (Biolab Diagnóstica S/A), antes e após tratamento do soro por 2 - mercaptoetanol<sup>5</sup>.

**Soros** - Os 69 soros ensaiados, 23 de cada um dos perfis sorológicos, haviam sido separados de sangue de punção venosa e conservados a -20° C por períodos variáveis, depois de submetidos aos testes sorológicos (de imunofluorescência IgG e IgM, de captura de IgM e de hemaglutinação) para determinação do perfil sorológico para a toxoplasmose. De acordo com os resultados desses testes os soros puderam ser classificados como de fases aguda (perfil I), de transição (perfil II) e crônica (perfil III)<sup>1,2</sup>. Como marcadores de perfil I, de toxoplasmose recente, foram tomados um diferencial de pelo menos 4 vezes entre altos títulos do teste IF - IgG e baixos títulos do teste HA, e a presença de anticorpos IgM. Esta foi indicada por

títulos maiores do que 1:64 do teste IF - IgM, de um diferencial de pelo menos 4 vezes entre títulos do teste de hemaglutinação antes e após o tratamento do soro por 2 mercaptoetanol, e pela positividade do teste de captura de IgM. O perfil III, de toxoplasmose crônica, foi caracterizado pela negatividade de todos os testes para anticorpos IgM e por baixos títulos do teste de IF - IgG ( $\leq 1:4096$ ) e do teste de HA ( $\leq 1:1024$ ). O perfil II, de fase de transição, foi marcado por títulos igualmente elevados nos testes de IF - IgG e HA, e por títulos inferiores a 1:64 no teste IF - IgM, ausência de diferencial entre títulos de HA antes e após tratamento do soro por 2ME. Eventualmente o teste de captura de IgM era positivo, nesses casos em geral observando-se valores de absorbância pouco elevados com relação ao limiar de reatividade do teste.

## RESULTADOS

### Determinação da Reatividade dos Soros -

Para uma série de soros, dos diferentes perfis, foram construídas curvas dose-resposta no teste imunoenzimático, relacionando-se diluições do soro e respectivas absorbâncias. Foram obtidas curvas sigmoidais, mas que apresentavam segmentos retilíneos extensos, com inclinações angulares bastante constantes, exceto para soros de reatividade muito baixa. Em vista do paralelismo desses segmentos, tomou-se como título dos soros a diluição correspondente a uma densidade óptica de 0,5, como anteriormente descrito<sup>6</sup> e foi possível calcular o título (T) a partir da densidade óptica (a) de uma única diluição (A) do soro, segundo a fórmula  $\log T = \log A + (a-0,5) K$ , sendo K a inclinação angular constante das curvas.

Para os testes, os soros foram ensaiados em diluições de 1:200, 1:2000 e 1:20000, escolhendo-se para cálculo de títulos a diluição com absorbância mais próxima de 0,5, ou fazendo-se a média dos títulos calculados para duas diluições com absorbâncias respectivamente acima e abaixo desse valor, mas dentro da faixa de 0,3 a 1,2, correspondente aos segmentos retilíneos da maioria das curvas.

Para cálculo da avidéz das IgG, geralmente não foi necessário o cálculo de títulos para a comparação dos níveis de reatividade, sendo suficientes os valores de absorbâncias, como adiante referido.

O quadro 1 apresenta alguns exemplos de resultados do teste de avidéz.

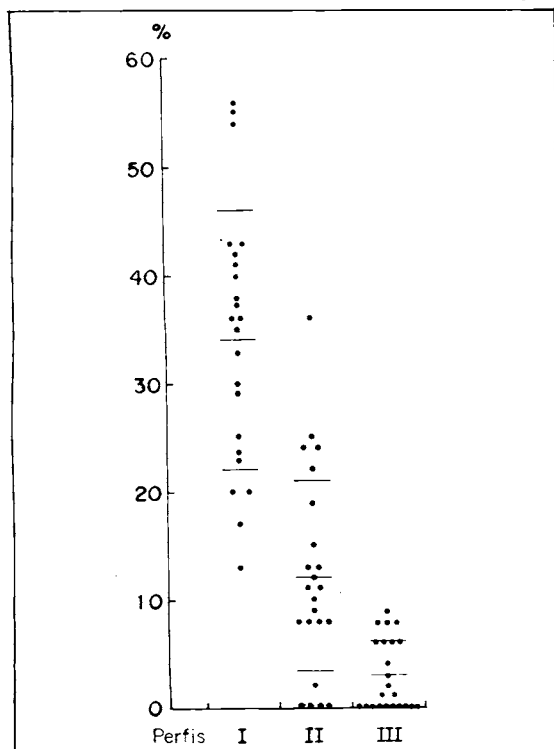


Fig. 1 - Avidéz de anticorpos específicos IgG, correspondente a porcentagens de queda de títulos, em soros de toxoplasmose recente (Perfil I), de fase de transição (Perfil II) e de toxoplasmose crônica (Perfil III).

Assinalados os valores médios e respectivos desvios padrão.

**QUADRO I**  
**ABSORBÂNCIAS OBSERVADAS E AVIDEZ DA IgG DE ALGUNS SOROS DE PACIENTES COM TOXOPLASMOSE NAS DIFERENTES FASES**

Soro	Perfil	Diluições							
		1:200		1:2000		1:20000		Q% ***	
		S*	U**	S	U	S	U	T****	A*****
11491	I	1,30	0,85	0,43	0,19	0,10	0,03	38%	35%
14552	I	0,47	0,21	0,09	0,03	-	-	35%	55%
11634	I	2,60	1,94	1,40	0,65	0,35	0,12	78%	54%
24334	II	>2	2,0	0,77	0,68	0,15	0,14	13%	12%
24490	II	>2	>2	>2	1,67	0,73	0,56	24%	23%
24519	III	0,50	0,50	0,04	0,04	-	-	0%	0%
21143	III	1,40	1,30	0,31	0,29	-	-	3%	1%

S\* = sol. salina, U\*\* = sol. de ureia, Q%\*\*\* = porcentagem de queda de títulos, T\*\*\*\* = cálculo a partir de títulos, A\*\*\*\*\* = cálculo a partir de absorvâncias.

**QUADRO 2**  
**RESULTADOS DE TESTES DE AVIDEZ PARA IgG ANTITOXOPLASMA REALIZADOS EM DIAS DIFERENTES**

Soro	1º Teste	2º Teste	3º Teste
24490	23%	20%	21%
24287	9%	13%	18%
24334	13%	16%	19%
24451	23%	13%	25%
24359	3%	10%	4%
24569	6%	-	0%
24467	0%	2%	4%
24519	0%	0%	6%

Para os soros de perfil I a média de porcentagens de queda de reatividade e desvio padrão foi de  $34,1 \pm 12,1\%$ . Para os soros de perfil II foi de  $12,1\% \pm 9,4\%$  e para os de perfil III  $3,0\% \pm 3,4\%$ , (Figura 1). Observou-se boa reprodutibilidade dos resultados entre testes realizados em dias diferentes, como se pode observar no quadro 2.

**DISCUSSÃO**

A avaliação sorológica do tempo de vigência da infecção toxoplásmica assume importância como apoio ao diagnóstico de infecções recentes. É nesta fase que ocorrem não só as eventuais manifestações clínicas da forma aguda, como tam-

bém há possibilidade de transmissão congênita da infecção<sup>2</sup>.

O principal marcador sorológico de infecção recente é a presença no soro, de anticorpos específicos IgM. Pela técnica de imunofluorescência indireta esses anticorpos podem ser detectados desde muito precocemente na infecção até algumas semanas ou poucos meses depois. Porém esse teste sofre interferências, como a de fatores reumatóides e da competição de anticorpos IgG, para cuja neutralização se faz necessária a remoção das IgG da amostra a ser testada.

O teste imunoenzimático de captura de IgM não sofre essas interferências, mas porque nitidamente mais sensível, passa a detectar anticorpos IgM por períodos mais longos, o que até certo ponto pode prejudicar seu significado de marcador de infecção recente. O teste de hemaglutinação, com hemácias sensibilizadas com antígenos citoplasmáticos e de paredes do toxoplasma, também pode detectar anticorpos IgM, indicados pela queda de títulos que é observada após tratamento do soro pelo 2-mercaptoetanol<sup>5</sup>. Este teste não sofre interferência de fatores reumatóides, mas para maior sensibilidade pode exigir a remoção prévia de anticorpos IgG do soro<sup>3</sup>. O teste de hemaglutinação também representa um segundo marcador de infecção recente, pois que nas primeiras semanas da infecção observa-se acentuada disparidade entre altos títulos do teste IF-IgG e baixos títulos do teste HA. Essa disparidade não ocorre nas fases crônica e de transição da toxoplasmose<sup>2</sup>. A escolha da solução de uréia 6 M como agente dissociante de complexos imunes de baixa afinidade, como proposto por HEDMAN et al.<sup>7</sup>, mostrou-se satisfatória, resultando em quedas de reatividade inferiores a 10% na toxoplasmose crônica ou progressa, sendo sensivelmente mais elevada nas formas recentes.

A reprodutibilidade intertestes da medida de avidéz das IgG específicas como aqui referida, mostrou-se adequada, pois que as variações observadas dentro de um mesmo grupo de soros foram menores do que as diferenças entre grupos de diferentes perfis.

Assim, a determinação da avidéz ou afinidade de anticorpos IgG antitoxoplasma pode ser utilizada como mais um marcador de infecção recente. Teste simples, pode complementar a definição de

um perfil sorológico, especialmente quando insuficientemente delineado pelos demais marcadores sorológicos.

## SUMMARY

### Avidity of specific IgG antibody as a marker of recent and old toxoplasma infections.

For serologically characterizing a recent primary toxoplasma infection, the low avidity of IgG specific antibodies was studied. Avidity was evaluated as the decrease of IgG antibody titers in ELISA after treating plates with 6 M urea, as a dissociating solution of low avidity antigen-antibody complexes. Sixty nine serum samples were studied, presenting characteristic patterns of recent, transitional or chronic toxoplasmosis. Serological patterns were determined according to results of IgG and IgM immunofluorescence, IgM-capture, and hemagglutination tests. Twenty three serum samples from each of the referred patterns I, II and III were titrated. For chronic toxoplasmosis infections, which presented a serological pattern III, observed decrease of titers was  $3\% \pm 3\%$ . For pattern I recent toxoplasmosis sera it was  $34\% \pm 12\%$ , and for transition pattern II,  $12\% \pm 9\%$ .

Thus, a low avidity of IgG specific antibodies can be applicable for the diagnosis of a recent toxoplasmosis infection.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMARGO, M.E. & LESER, P.G. - Diagnostic 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. CAMARGO, M.E.; LESER, P.G. & ROCCA, A. - Definições de perfis sorológicos na toxoplasmose. Importância diagnóstica e epidemiológica. *Rev. bras. Pat. clín.*, 13: 113-127, 1977.
3. CAMARGO, M.E.; LESER, P.G. & ROCCA, A. - Detection of IgM anti-toxoplasma antibodies in acute acquired and congenital toxoplasmosis after protein A treatment of serum. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 25: 201-206, 1983.
4. CAMARGO, M.E.; LESER, P.G.; GUARNIERI, D. &

- ROCCA, A. - Padronização de testes sorológicos para toxoplasmose, problema urgente da patologia clínica. *Rev. bras. Pat. clín.*, 13: 1-5, 1977.
5. CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W.; ROCCA, A. & BELEM, Z.R. - Um teste prático para sorologia da toxoplasmose, o teste de hemaglutinação. Estudo comparativo com os testes de imunofluorescência e imunoenzimático de captura de IgM. *Rev. bras. Pat. clín.*, 22: 196-201, 1986.
6. CAMARGO, M.E.; SILVEIRA, L.; FURUTA, J.A.; OLIVEIRA, E.P.T. & GERMEK, O.A. - Immunoenzymatic assay of anti-diphtheric toxin antibodies in human serum. *J. clín. Microbiol.*, 20: 772-774, 1984.
7. HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPAIA, I. & MAKELA, O. - Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J. infect. Dis.*, 159: 736-740, 1989.
8. THOMAS, H.I.J. & MORGAN - CAPNER, P. - Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Epidem. Infect.*, 101: 591-598, 1988.
9. WERBLIN, T.P.; KIM Y.T.; QUAGLIATA F. & SISKIND G.W. - Studies on the control of antibody synthesis. III. Changes in heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. *Immunology*, 24: 477-492, 1973.

Recebido para publicação em 10/9/1990.

Aceito para publicação em 13/12/1990.