

FLÁVIA GALINDO SILVESTRE

**ESTUDO DA INCIDÊNCIA/PREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE EM
PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS POR TERAPIA PÓS-
TRANSPLANTE E MALIGNIDADE**

Monografia apresentada ao Curso de
Ciências Biológicas, como requisito para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador(a): Vanete Thomaz Soccol

Co-orientador(a): Ida Cristina Gubert

CURITIBA

2000

*A todos que possam aproveitar
de alguma forma, o conteúdo
deste trabalho.*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes para mim: meu pai, Nilton Silvestre, minha mãe, Adalva Galindo Silvestre, aos melhores irmãos do mundo, Pedro Ivo e Fábio, minha avó, Cida, e ao meu namorado Juliano, pela ajuda neste trabalho, pelo carinho, compreensão, tolerância, e, principalmente, por me deixarem feliz, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Vanete Thomaz Soccol, a quem muito devo de minha formação. O seu profundo conhecimento, sua vontade de ensinar e formar novos profissionais motivaram-me na carreira de biólogo. Sua orientação segura e experiente, e o seu exemplo de grande profissional, me ajudaram para que eu pudesse subir mais um degrau da longa jornada do conhecimento.

À Professora Ida Cristina Gubert, que, com sua amizade, bondade e inesgotável dedicação ajudou-me na caminhada desta etapa de minha vida, tanto profissional, quanto pessoal. Como co-orientadora da tese, esteve sempre presente mostrando o melhor caminho a seguir.

Às Professoras Edilene Alcântara e Rosângela Paulino, e às colegas de trabalho, Andréa Soccol, Luciane, Juliana Tracz, Fernanda Rosalinski e Vanessa Piccolo pelo ótimo ambiente de trabalho, pela ajuda no desenvolvimento desta monografia e pela amizade.

À Doutora Fabiana Loss de Carvalho Contieri, e ao Doutor Ricardo Benvenuti, por possibilitarem a realização deste trabalho, pela dedicação e pela dignidade humana com que tratam seus pacientes.

À Janaína (Hospital de Clínicas), ao Doutor Henrique Lerner e à Doutora Inês Galvan Murai (Laboratório Frischmann Aisengart), por colaborarem na obtenção das amostras de soros e de outros reativos.

À Larissa Chiamolera e ao Adriano Viana, que sempre me ajudaram muito, não só no trabalho mas em todas as horas que eu mais precisei de amigos de verdade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	X
RESUMO.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO GERAL E JUSTIFICATIVA.....	3
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. O <i>Toxoplasma gondii</i>	4
3.2. Métodos Diagnósticos.....	7
3.3. Toxoplasmose na População animal.....	10
3.4. Toxoplasmose na População humana.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. MATERIAIS.....	21
4.1.1. Reativos e equipamentos.....	21
4.1.2. Amostras de soros.....	21
4.2. MÉTODOS.....	21
4.2.1. Obtenção das amostras de soro.....	21
4.2.2. Obtenção do antígeno para Método de ELISA.....	22
4.2.3. Teste de ELISA como imunodiagnóstico da toxoplasmose.....	23
4.2.4. Obtenção do antígeno para Método de IFI.....	28
4.2.5. Teste de IFI como imunodiagnóstico da toxoplasmose.....	29
4.2.6. Análise Estatística.....	32
4.2.7. Levantamento de prontuários de pacientes imunocomprometidos.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELISA.....	35
5.2. COMPARAÇÃO DE EFICIÊNCIA ENTRE AS TÉCNICAS DE ELISA E IFI.....	37
5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38

5.4. ESTUDO DA PREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS.....	39
5.5. ESTUDO DA INCIDÊNCIA DA TOXOPLASMOSE EM PACIENTES COM NEOPLASIAS.....	50
5.6. DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTI- <i>Toxoplasma</i> EM INDIVÍDUOS COM RISCO OCUPACIONAL.....	51
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	63
ANEXO 1. SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA A DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY (1951).....	64
ANEXO 2. SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA O TESTE DE ELISA.....	65
ANEXO 3. SOLUÇÕES UTILIZADAS NO TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	68
ANEXO 4. RESULTADOS OBTIDOS NAS TÉCNICAS DE IFI E ELISA PARA AS AMOSTRAS ANALISADAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Agentes comumente utilizados na clínica (ciclosporina e azatioprina) para suprimir a resposta de rejeição em diferentes fases do transplante.....	14
Figura 2. A estrutura de alguns agentes fúngicos imunossupressores.....	16
Figura 3. Cronologia dos descobrimentos e uso clínico dos agentes imunossupressores.....	17
Figura 4. Determinação de anticorpos pelo método de ELISA Indireto.....	24
Figura 5. Placa de ELISA mostrando reações de cor (amarela) que indicam reações positivas.....	25
Figura 6. Imunofluorescência Indireta.....	29
Figura 7. Número de transplantes realizados no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba em relação à faixa etária dos pacientes.....	41
Figura 8. Número de transplantes realizados no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba em relação ao sexo.....	41
Figura 9. Distribuição dos grupos sanguíneos eritrocitários (Sistema ABO) entre os pacientes submetidos a transplante renal.....	42
Figura 10. Distribuição dos grupos sanguíneos eritrocitários (Sistema Rh) entre os pacientes submetidos a transplante renal.....	42
Figura 11. Número de transplantes realizados em relação ao tipo de doador.....	43

Figura 12. Percentual de transplantes realizados no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba nas décadas de 80 e 90.....	44
Figura 13. Curvas de representação das respostas imunes primária e secundária com relação às classes de Imunoglobulinas.....	46
Figura 14. Resultados obtidos na análise de 32 soros pelos métodos de ELISA e IFI.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mecanismo de ação dos agentes imunossupressores químicos.....	17
Tabela 2. Número de casos relatados de toxoplasmose na análise de 128 pacientes acometidos por diferentes neoplasias.....	19
Tabela 3. Resultados obtidos na utilização das técnicas de ELISA e IFI.....	38
Tabela 4. Número e percentual de pacientes submetidos a algum tipo de diálise e transfusão.....	44
Tabela 5. Resultado dos exames para pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma</i> realizados no pré e pós-transplante nos 307 pacientes com sorologia disponível, no período de 1981 a 1999.....	45
Tabela 6. Frequência de coinfeções em casos relatados de toxoplasmose em pacientes com câncer.....	49
Tabela 7. Número de soros analisados, soros que apresentaram titulação positiva compatíveis com doença aguda, soros intermediários e soros não reagentes para ELISA e IFI.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFPR – Universidade Federal do Paraná

HUEC – Hospital Universitário Evangélico de Curitiba

T. gondii – *Toxoplasma gondii*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

IFI – Imunofluorescência Indireta

FC – Fixação do Complemento

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

MEIA – Micropartículas de Enzimaimunoensaio

CMV - Citomegalovírus

Tx - transplante

et al. – et alii (e outros)

Cols. - Colaboradores

D.O. – Densidade Óptica

RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. O gato é o hospedeiro definitivo e o homem e quase todas as espécies animais são os hospedeiros intermediários. No homem, o *Toxoplasma* comporta-se como agente dotado de alta infectividade e baixa patogenicidade em indivíduos adultos imunocompetentes e participa como infecção oportunista, em indivíduos imunodeprimidos (transplantados, HIV positivos, portadores de neoplasias). Nestes indivíduos a toxoplasmose causa coriorretinite, linfopatias e distúrbios neurológicos. Visando conhecer o índice de positividade de anticorpos anti-*Toxoplasma*, foram estudadas três populações humanas sujeitas a esta infecção: indivíduos imunocomprometidos por terapia imunossupressora, acometidos por neoplasias ou submetidos a transplante, e indivíduos em risco ocupacional e/ou exposicional. Para a primeira e terceira populações (indivíduos neoplásicos e indivíduos expostos à risco ocupacional) foi padronizada a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para a determinação da prevalência de títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma*. A técnica ficou padronizada com a concentração de 150ng de antígeno por poço (*well*), diluição do soro em 100 vezes e do conjugado em 10.000 vezes. O *cut-off* estabelecido foi 0,064 D.O. (densidade óptica). Para a padronização utilizou-se soros controles positivos e negativos. Para verificar se esta metodologia apresentava boa especificidade e sensibilidade, foi utilizada a técnica de IFI (Imunofluorescência Indireta) para comparação de resultados. Soros positivos e negativos na técnica de ELISA foram testados através do método de IFI. A comparação bruta entre os dois testes correspondeu em relação à especificidade 98,9% e à sensibilidade 80,0% . Os soros que se encontravam em *border-line* (considerados negativos para o teste de ELISA, mas com valor de absorbância muito próximo do valor de referência positivo), foram também testados pela IFI. Os resultados demonstram que os dois testes são equivalentes e que o teste de ELISA pode ser utilizado para diagnóstico em exame de rotina, e em enquetes epidemiológicas. O teste de Imunofluorescência deve ser utilizado como método diagnóstico individual, e servindo para informar ou confirmar outras provas sorológicas. Para o estudo da prevalência de títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma* foram analisados 32 soros de pacientes que se encontravam em terapia imunossupressora ocasionada por diferentes neoplasias. Os soros eram provenientes do Laboratório Frischmann Aisengart e do Hospital de Clínicas da UFPR, onde estes pacientes são controlados periodicamente. Oito (25%)

indivíduos apresentaram títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma*. Com relação ao terceiro grupo, analisou-se 72 soros de indivíduos expostos à risco ocupacional e/ou exposicional, onde três (4,2%) apresentaram título de anticorpos anti-*Toxoplasma*. Para o segundo grupo (indivíduos submetidos a transplante) foram revisados os prontuários de pacientes transplantados renais no período de 1980 a 1999 na Unidade de Transplante Renal do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC). Do total de transplantes analisados, 307 apresentavam sorologia disponível para toxoplasmose e em 134 prontuários foi possível o acompanhamento sorológico pré e pós-transplante, onde se observou sete pacientes com primoinfecção (IgG e IgM positivos), cinco pacientes com reagudização da cepa latente e 60 pacientes apresentando infecção crônica (mantiveram-se IgG positivo no pós-transplante). Porém, sem manifestação clínica da doença, o que os torna população de risco. Em 173 pacientes só se encontrava disponível a sorologia pré ou pós-transplante, impossibilitando a análise do curso da doença. Mas, é importante ressaltar, que sete pacientes mostraram-se positivos no pós-transplante, sendo que dois destes pacientes apresentaram manifestações clínicas, como febre e coriorretinite e abscesso cerebral, o que exigiu tratamento específico. Apesar da persistência sorológica de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma* no período pós-transplante, colocando estes indivíduos no grupo de risco, a sobrevida dos pacientes analisados foi de 99,7%. É importante ressaltar que o próprio órgão transplantado e o sangue, de possíveis transfusões, podem atuar como fonte transmissora de *Toxoplasma*. Nas duas populações de risco analisadas o índice de indivíduos que tiveram contato primário com o parasito é elevado (25% neoplásicos e 53,1% transplantados), o que os torna população de risco, uma vez que estes indivíduos estão em constante estado de imunodepressão. Para indivíduos expostos ao risco ocupacional o índice encontrado é baixo, mas está dentro dos dados encontrados na literatura.

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma antroponose transmissível de animais ao homem, causada por um parasito intracelular obrigatório, denominado *Toxoplasma gondii*. Este protozoário foi primeiramente descrito em 1908, simultaneamente por Splendore e por Nicolle e Manceaux, que o isolaram, respectivamente, em coelho e no roedor norte-africano *Gondii* (NEVES, 1995). Durante os últimos anos, maior importância passou a ser concedida à toxoplasmose, porque os estudos sobre esta afecção demonstraram que a infecção causada pelo *Toxoplasma gondii* é realmente problema comum e não simples doença excepcionalmente diagnosticada (AMATO NETO, 1982).

Várias características estão ligadas à infecção pelo *Toxoplasma*: presença do parasita em muitas espécies animais; ampla disseminação da doença; aspectos epidemiológicos ainda insuficientemente esclarecidos; modalidades de transmissão não completamente estabelecidas quanto ao tipo adquirido da parasitose; ocorrência de múltiplas facetas clínicas; possibilidade de confusão com outras entidades mórbidas, sob o ponto de vista anatomopatológico; relativa frequência de concomitância com outras moléstias (AMATO NETO, 1982).

O parasita tem grande difusão mundial, sendo que as maiores soroprevalências são encontradas nas áreas tropicais úmidas. Com uma distribuição cosmopolita, e capacidade de parasitar o homem e animais de diferentes tipos, incluindo anfíbios, peixes, répteis e aves, este protozoário é considerado um parasita poli-heteroxeno (MARTINS & VIANA, 1998).

A grande importância médica da toxoplasmose decorre de seu aspecto endêmico, traduzido pela elevada prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* na população.

Os humanos podem adquirir a infecção por vários meios, através da ingestão acidental de oocistos provenientes de fezes de gato, ingestão de carne mal cozida através de cistos com bradizoítos na musculatura, intra-uterinamente e por transfusões sanguíneas. O grande número de pessoas soropositivas para *T. gondii* sugere que a maioria das infecções seja benigna, com a grande maioria se apresentando assintomática ou com sintomatologia leve. Os sintomas mais severos são observados em infecções congênicas e em pacientes imunossuprimidos. No grupo de risco incluem-se os transplantados, indivíduos em tratamento quimioterápico, portadores de HIV e indivíduos que se submetem a transfusões (CONTRERAS et al., 1996). Geralmente, a toxoplasmose em indivíduos imunodeficientes

envolve a reativação da primoinfecção. Nestes indivíduos a defesa imunitária do hospedeiro parece ser incapaz de controlar a multiplicação dos taquizoítos, e observa-se então uma multiplicação rápida dos parasitos levando a necroses tissulares focalizadas e uma eventual disseminação por via sangüínea. As lesões observadas são principalmente cerebrais, caracterizadas por sinais neurológicos, podendo haver também, uma generalização. Em pacientes HIV positivos, a toxoplasmose tem sido uma causa de óbito com índices bastante elevados (LEPORT & REMINGTON, 1992; DEROUIN et al., 1991, 1992).

Em animais domésticos a infecção por *T. gondii* representa graves perdas econômicas, pelos abortos causados.

Em função da variedade fisiopatológica e clínica da infecção toxoplásmica, as modalidades de diagnóstico serão diferenciadas em se tratando de uma reativação em indivíduos imunodeprimidos, de infecção neonatal ou infecção primária. O laboratório desempenha papel fundamental no imunodiagnóstico da toxoplasmose.

O diagnóstico conclusivo é feito pela demonstração do parasita. No entanto, a pesquisa pelo exame direto é difícil e deve frequentemente, ser complementada por métodos indiretos tais como inoculação em animais de laboratório, cultura celular ou técnicas sorológicas. Os métodos diretos são importantes quando os diagnósticos sorológicos não apontam dados conclusivos (DEROUIN & GARIN, 1992).

As técnicas sorológicas habitualmente utilizadas no diagnóstico da toxoplasmose são: IFI (Imunofluorescência Indireta), Aglutinação direta, ISAGA e ELISA Indireta (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) clássica. Recentemente, a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi adaptada para o diagnóstico da toxoplasmose.

2. OBJETIVO GERAL E JUSTIFICATIVA

O avanço da medicina na área dos transplantes e da terapia do câncer tem proporcionado a um número crescente de pacientes uma maior taxa de sobrevivência, com uma certa qualidade de vida. No entanto, fruto da terapia imunossupressora, é crescente o número de indivíduos imunocomprometidos que muitas vezes vão a óbito por infecções oportunistas como a causada pelo *Toxoplasma gondii*. Se, outrora, a comunidade científica muito debateu sobre a origem destas infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, hoje não resta dúvida de que seja por reativação de primoinfecção, por aquisição do patógeno via transplante ou pela pura e simples imunossupressão. Estes agentes oportunistas se apresentam como grande ameaça à sobrevivência destes indivíduos. A gravidade da toxoplasmose nos pacientes imunocomprometidos justifica um estudo da prevalência desta afecção nesta população, até como forma de uma ação profilática por parte dos envolvidos nos cuidados com os portadores desta condição e porque não, na seleção de doadores de órgãos e sangue.

Este trabalho tem como objetivo o estudo da incidência da toxoplasmose em indivíduos imunodeprimidos por terapia imunossupressora.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização da técnica de ELISA;
- Comparação dos resultados obtidos na padronização da técnica de ELISA e de Imunofluorescência Indireta (IFI);
- Determinação da especificidade e sensibilidade das técnicas utilizadas;
- Levantamento de prontuários de pacientes imunodeprimidos por terapia imunossupressora pós-transplante renal;
- Determinação da prevalência de títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em pacientes imunocomprometidos por malignidade;
- Determinação da prevalência de títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em indivíduos com risco ocupacional e/ou exposicional;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário coccídeo, parasita intracelular obrigatório que infecta a grande maioria dos animais, inclusive o homem.

No Brasil foram concretizadas muitas contribuições sobre o *Toxoplasma* e a toxoplasmose. Já em 1908, esse parasito mereceu descrição original por parte de Splendore, que teve a oportunidade de encontrá-lo no coelho; no mesmo ano, Nicolle e Manceaux verificaram-no no *Gondii*, roedor norte-africano, tendo denominado-o de *Leishmania gondii*. Posteriormente, esses pesquisadores constataram que não se tratava da *Leishmania* e passaram a considerá-lo como *Toxoplasma gondii*. Em 1973, com o aprofundamento dos estudos por microscopia eletrônica e sobre o ciclo evolutivo do protozoário, o *Toxoplasma* ficou classificado no Filo Protozoa, Subfilo Apicomplexa e Classe Sporozoa.

Com relação à morfologia, o *Toxoplasma* apresenta dimensões variáveis, entre 4 a 7 micra de comprimento por 2 a 4 micra de largura, apresentando-se em forma de crescente ou arco, com uma extremidade mais afilada que a outra. As alterações de tamanho estariam ligadas a maior ou menor patogenicidade das cepas. É gram negativo, com núcleo único e citoplasma homogêneo, desprovido de pigmentos e cílios. Apresenta na extremidade mais fina, um complexo apical, que é fundamental na penetração do parasita nas células. Este complexo é constituído de um conóide, de onde partem longos filamentos cilíndricos, em número médio de 16, orientados longitudinalmente e denominados de toxonemas. A presença de fibrilas no citoplasma possibilita a movimentação do parasito (GIOVANNONI, 1958).

Embora seja um parasito com pouca especificidade quanto ao hospedeiro, já que diversas espécies de vertebrados servem como hospedeiros intermediários, os membros da Família Felidae (domésticos e selvagens) são os únicos hospedeiros definitivos, visto que são os únicos liberam oocistos esporulados através das fezes, favorecendo a contaminação de pessoas e animais (FRENKEL et al., 1970). Esses oocistos são considerados a forma infectante do parasito, quer pela facilidade de contaminação (fezes no solo), quer pela elevada resistência aos agentes físicos e químicos. Mas, dependendo do hospedeiro e da via de transmissão, podem ser infectantes em qualquer que seja o seu estágio evolutivo (taquizoítos, bradizoítos e oocistos), fato que amplia enormemente, em condições naturais e em laboratório, os riscos de infecção para os animais domésticos e o homem (VIDOTTO, 1992).

Os taquizoítos são as formas que se multiplicam rapidamente; os bradizoítos são as formas de multiplicação lenta, encontrada nos cistos teciduais e os esporozoítos encontrados nos oocistos.

O *Toxoplasma* apresenta um ciclo de vida complexo com duas fases distintas. Uma fase assexuada ou extra-intestinal, que ocorre nos tecidos de vários hospedeiros. A outra denominada de fase sexuada ou enteroepitelial, ocorre nas células do epitélio intestinal de gatos jovens e outros felídeos não imunes (FRENKEL, 1973; PÉSSOA, 1988). Após serem ingeridos pelos hospedeiros, as paredes externas dos cistos ou dos oocistos são rompidas por degradação enzimática e as formas infectantes (bradizoítos e esporozoítos, respectivamente) são liberadas no lúmen intestinal. Eles rapidamente invadem e se multiplicam dentro das células circundantes, onde se tornam taquizoítos. A disseminação dos taquizoítos ocorre pelo rompimento das células infectadas, seguida da invasão de células vizinhas. Eles invadem o tecido linfóide associado ao intestino e se disseminam, pelos vasos linfáticos, sangue e macrófagos infectados, para praticamente todos os órgãos. Essa série de eventos caracteriza o ciclo extra-intestinal. Em aproximadamente duas semanas, o hospedeiro começa a desenvolver imunidade, que faz com que a taxa de multiplicação do parasito diminua. Os organismos com lenta taxa de multiplicação, chamados bradizoítos, confinam-se num cisto de parede elástica, no citoplasma das células infectadas.

No gato, além desse ciclo, ocorre também o ciclo sexual nos intestinos. Após ingerir tecidos contendo cistos, as paredes destes cistos são dissolvidas pelos sucos digestivos no estômago e intestino delgado. Os bradizoítos liberados penetram nas células epiteliais e iniciam uma série de gerações sexuadas geneticamente determinadas: o gameta masculino fertiliza o gameta feminino e uma parede é formada ao redor do zigoto, a fim de formar um oocisto. Os oocistos não estão esporulados ao passar nas fezes e, portanto, não são infectantes. Após a exposição ao ar, eles esporulam e então passam a conter dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (MARTINS & VIANA, 1998).

Em seu ciclo biológico, o *Toxoplasma*, multiplica-se por divisão binária. PEREIRA DE CASTRO (1955) demonstrou, em cultura de tecido, que o *T. gondii* também se reproduz através da esquizogonia. Esse processo é esporádico e, às vezes, concomitante com o habitual, em uma mesma célula. Habitualmente, o protozoário é mantido no laboratório, em camundongos, através de repetidas inoculações.

DUBEY (1986) estabelece três vias primárias de transmissão: congênita; ingestão de carne crua ou mal cozida contaminada com cistos e ingestão de fezes contaminadas com oocistos. Os alimentos vegetais, contaminados com oocistos e os de origem animal, principalmente carne suína contendo cistos, leite não pasteurizado e ovos (GARCIA et al., 1999), são grandes responsáveis pela infecção humana, além do contato direto com os gatos domésticos, que favorece a infecção por ingestão de oocistos presentes nas fezes destes animais (GERMANO et al., 1981).

As respostas imunes de um hospedeiro à toxoplasmose são complexas e envolvem mecanismos humorais e celulares. Quando um hospedeiro se infecta com o parasita ocorre a multiplicação na porta de entrada. Em seguida, a sua disseminação por todo o organismo ocorre através das vias sanguínea e linfática (DEROUIN & THULLIEZ, 1993). Nos estágios taquizoíticos, os parasitas crescem dentro das células, e quando o número de microorganismos celulares se torna excessivo, a célula infectada se rompe e os taquizoítos são liberados para invadir outras células. Eles penetram nessas células por meio de um mecanismo que lembra uma fagocitose, mas os taquizoítos que invadem os macrófagos normais não são destruídos (embora os lisossomos se desloquem em direção ao fagossomo, a fusão não ocorre). Como resultado, os taquizoítos do *Toxoplasma* podem crescer dentro das células em um ambiente livre de anticorpos ou de enzimas lisossomais (TIZARD, 1998).

Os parasitas quando estão na forma de bradizoítos, encistam nos tecidos, e em particular nos músculos estriados. Durante este período, inicia-se a formação de anticorpos específicos e o desenvolvimento de mecanismos imunes celulares. Cada cisto pode conter centenas de bradizoítos, e estes cistos são resistentes ao ataque imune, podendo persistir nos tecidos durante toda uma vida (SMITH, 1997). O resultado final da infecção pelo *T. gondii* depende, por um lado, da espécie do hospedeiro, e dentro da mesma espécie, de fatores imunológicos e genéticos, e por outro lado, da multiplicidade da infecção e da virulência da cepa.

As formas mais graves da toxoplasmose são observadas na contaminação uterina e na reagudização ou primo-infecção em indivíduos imunocomprometidos, devido aos imunossupressores a que são submetidos para evitar a rejeição do transplante (DEROUIN & THULLIEZ, 1993; MORLAT & LEPORAT, 1997).

ROBERTS et al. (1994), estimou em 5,3 bilhões de dólares o custo anual das perdas com cuidados médicos, perda em produtividade e custos com educação especial para a

toxoplasmose congênita nos Estados Unidos no ano de 1993, onde a carne suína é considerada a principal via de transmissão para os seres humanos (MARTINS & VIANA, 1998). Estimativas indicam que aproximadamente 30% dos adultos nos Estados Unidos apresentam anticorpos anti-*Toxoplasma*, no Continente Europeu este índice varia de 50 a 80% dos adultos (SMITH, 1997).

Vacinas satisfatórias contra o *T. gondii* para uso humano ainda não foram desenvolvidas (SMITH, 1997).

3.2. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser clínico e laboratorial. O diagnóstico clínico é um tanto difícil por ser um processo sistêmico, geralmente com baixa parasitemia e pela característica assintomática da patologia, podendo assemelhar-se a outras doenças (UCHÔA et al., 1999). O diagnóstico laboratorial serve para comprovação da doença, e compreende exame parasitológico e testes imunológicos.

O diagnóstico parasitológico é feito pelo exame das fezes do hospedeiro definitivo à procura de oocistos, através dos métodos de Faust e cols (1939), Willis & Mollay (1921), Hoffman, Pons & Janer (1934) e Sheather (1929). Como os oocistos não são comumente encontrados nas fezes, testes sorológicos têm sido utilizados para a detecção do nível de anticorpos circulantes no hospedeiro definitivo. Para os hospedeiros intermediários o diagnóstico parasitológico torna-se difícil pelo curto período que ocorre a multiplicação dos taquizoítos na fase aguda, o que torna necessário dispor de outros meios diagnósticos. Os métodos diretos são importantes quando os diagnósticos sorológicos não apontam dados conclusivos (DEROUIN & GARIN, 1992).

Alguns trabalhos científicos relacionados ao imunodiagnóstico da toxoplasmose vêm sendo desenvolvidos desde os anos 40, passando por diferentes fases, sofrendo modificações de acordo com a evolução das técnicas para diagnóstico sorológico. Dentre as técnicas mais empregadas pode-se destacar:

1. Reação de Sabin e Feldman ou Teste do Corante: foi uma das primeiras provas de boa sensibilidade e especificidade desenvolvida, ainda em uso em alguns laboratórios (VIDOTTO, 1992). Utiliza taquizoítos vivos como antígeno, soro suspeito, fator acessório e azul de metileno. É considerada uma prova padrão para avaliação de outras técnicas

sorológicas (CALAMEL & DUFOUR, 1985; WILSON et al.,1990). Estudo realizado por GIOVANNONI (1958) utiliza esta prova, demonstrando 51,50% de positividade para toxoplasmose em cães da Região Metropolitana de Curitiba.

2. Fixação do Complemento (FC): esta técnica requer antígeno solúvel do parasita. Sua sensibilidade é baixa e a positividade é revelada tardiamente (VIDOTTO, 1992).

3. Hemaglutinação Indireta (IHA): foi desenvolvida por JACOBS & LUNDE (1957) e passou por várias adaptações nos últimos anos (VIDOTTO, 1992). Utiliza antígenos solúveis. É uma técnica simples e não é espécie – específica, podendo ser usada para soros humanos e animais. Caracteriza-se pela elevada praticidade. Os maiores inconvenientes desta técnica são as dificuldades na estabilização das hemácias sensibilizadas, a variação dos antígenos, por detectar anticorpos no soro mais tardiamente que o Teste do Corante e Imunofluorescência e não permitir o diagnóstico de infecção congênita (WILSON et al.,1990). Trabalho realizado por ALVES (1997) na Cidade do Recife, utilizando esta técnica, mostrou que 47,59% dos soros caninos analisados apresentaram reação positiva para toxoplasmose.

4. Aglutinação Direta: desenvolvida em 1959 e modificada por DESMONTS & REMINGTON (1980), é uma técnica simples com boa sensibilidade e correlaciona-se bem com o Teste do Corante e R.I.F.I. (VIDOTTO, 1992).

5. Aglutinação pelo Látex: baseada na aglutinação de anticorpos com partículas de látex sensibilizadas com frações solúveis de antígenos, detecta IgG em soros humanos e animais e uma pequena porcentagem de reações falso – positivas tem sido atribuída a anticorpos IgM não específicos (HOLLIMAN et al., 1989).

6. Imunofluorescência Indireta (I.F.I.): desenvolvida nas décadas de 30 e 40, consolidou-se no uso rotineiro, na maioria dos laboratórios, a partir dos anos 60 (VIDOTTO, 1992), e atualmente tem sido a técnica mais utilizada para o estudo da toxoplasmose em cães (DESMONTS et al., 1985; PRATLONG et al., 1996). Esta técnica pode ser utilizada tanto para detecção de antígenos celulares como também para pesquisa de anticorpos IgG e IgM no soro, contudo, reações positivas causadas por fator reumatóide e falso – negativas por bloqueio de IgG anti-*Toxoplasma* específica foram observadas no teste com IgM. Apresenta alta especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade, porém requer equipamentos de alto custo, teste individual, pessoal técnico altamente treinado e a leitura não é automatizada. A Imunofluorescência Indireta é mais vantajosa que a Direta, porque o anticorpo na IFI não necessita estar marcado com o fluorocromo, o que otimiza a técnica, já que a marcação do

anticorpo primário é freqüentemente um fator limitante; métodos indiretos evitam a perda de anticorpos que normalmente acontece durante radiomarcção e também, aumentam a sensibilidade na marcação porque reativos de fluorocromo múltiplos ligarão a cada molécula de anticorpo primário no método direto (KUBY, 1995).

7. Enzimaimunoensaio (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA): método desenvolvido entre o final da década de 60 e início da década de 70. Atualmente consolidou-se como excelente técnica para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros humano e animal, superando em sensibilidade a já consagrada R.I.F.I. A técnica de ELISA apresenta maiores vantagens por ser uma técnica de fácil execução, que permite o processamento de várias amostras simultaneamente, o que possibilita estudos epidemiológicos, e que utiliza leitura automatizada; é altamente sensível e específica (CALAMEL & LAMBERT, 1983; MINOZZO, 1997). Um grande número de variações do método de ELISA vem sendo desenvolvido, tanto para detecção como para quantificação de antígenos e anticorpos. Cada tipo de ELISA pode ser usado qualitativamente para detectar a presença de anticorpo ou antígeno. A ELISA Indireta tem sido o método de escolha para detectar ou quantificar a presença de anticorpos (KUBY, 1995).

8. Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR): recentemente a técnica de PCR foi adaptada para o diagnóstico da toxoplasmose, utilizando genes únicos (P30) ou repetidos (gene B₁, seqüência TGR₁E, ADN_r) do *Toxoplasma gondii* (BRETAGNE, et al., 1992). Todas as técnicas de PCR são de grande sensibilidade e especificidade, permitindo detectar um só parasita. Através deste método, a toxoplasmose pode ser evidenciada no líquido cerebrospinal, líquido amniótico e nas biópsias (RÖSE, 1997).

Estudos combinados de duas ou mais técnicas são, às vezes, necessários para confirmar o diagnóstico. Assim, estas técnicas utilizadas complementarmente aumentam a sensibilidade dos resultados chegando até 89,5% (SAVVA et al., 1990; GROVER et al., 1990; DEROUIN & THULLIEZ, 1993; PRATLONG, 1996).

Vários autores têm comparado as técnicas de IFI, ELISA e FC, verificando boa concordância entre os resultados e sugerem que a técnica de ELISA em futuro próximo poderá substituir a técnica de IFI. Por outro lado, muitas vezes observa-se que a concordância entre os resultados obtidos por IFI e ELISA não é absoluta e sugere que estas diferenças sejam devidas ao uso de antígenos distintos - íntegro na IFI e solúvel na ELISA - detectando,

neste último, anticorpos de aparecimento mais tardio além da diferença de qualidade entre os fabricantes de conjugados fluorescentes e enzimáticos (UCHÔA et al., 1999).

3.3. TOXOPLASMOSE NA POPULAÇÃO ANIMAL (PRINCIPALMENTE CANINA E FELINA)

Há uma grande variação nos efeitos causados pela toxoplasmose nos animais hospedeiros intermediários, dependendo da espécie infectada. A toxoplasmose fatal pode ser observada em marsupiais e macacos. Entretanto, galinhas, suínos, bovinos e cavalos raramente mostram doença clínica. Em ovelhas e cabras as infecções por *T. gondii* são a causa principal de aborto; todavia, ovelhas geralmente apresentam infecções subclínicas e cabras podem apresentar toxoplasmose clínica severa (SMITH, 1997). A infecção pelo *T. gondii* pode também exacerbar as infecções virais em ovelhas e cordeiros.

Os cães são considerados animais de alta receptividade para a toxoplasmose devido ao hábito alimentar, que facilita a ingestão de tecidos contaminados com cistos e o contato com solo contaminado com oocistos esporulados (GERMANO et al., 1985).

No que diz respeito à produção animal, a toxoplasmose provoca grandes prejuízos devido às infecções congênitas, abortos e mortalidade neonatal (MARTINS & VIANA, 1998). Em cães jovens é caracterizada como doença aguda de curta duração, podendo provocar pústulas abdominais, sialorréia, ataques epileptiformes e diarreia sanguinolenta. Em cães adultos é uma doença de curso sub-clínico, causando encefalite, paralisia geral, cegueira e midríase permanente (RIBEIRO et al., 1992). No cão, assim como no homem, a infecção é de evolução crônica, assintomática na grande maioria dos casos, mas diante de condições imunossupressoras manifesta-se como doença grave. Do ponto de vista de Saúde Pública, a infecção na população canina significa que a área envolvida representa nicho ecológico para o *T. gondii* e, conseqüentemente, um risco para a população humana (GERMANO et al., 1981).

O papel do gato nesta zoonose está relacionado com a produção de oocistos e a perpetuação da doença no meio ambiente e na cadeia alimentar. O gato elimina, para o ambiente, cerca de 100.000 oocistos/g de fezes. Entretanto, os oocistos devem esporular antes de se tornarem infectantes. Esse processo leva de um a cinco dias após a excreção. A esporulação ocorre no ambiente e é dependente de temperatura e umidade, e os oocistos podem persistir no ambiente por até dois anos. Os oocistos são excretados por apenas 1 a 2

semanas e, provavelmente, menos de 1% da população felina, num determinado momento, deve estar excretando oocistos (MARTINS & VIANA, 1998). Os gatos, em geral, não voltam a excretar oocistos quando reinfetados, pois desenvolvem imunidade.

3.4. TOXOPLASMOSE NA POPULAÇÃO HUMANA

O *Toxoplasma*, em relação ao hospedeiro humano, comporta-se como agente dotado de alta infectividade e de baixa patogenicidade em indivíduos adultos. Muito embora seja elevada a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* na população, indicando participação parasitária pregressa ou em curso, apenas uma reduzida porcentagem dos indivíduos apresenta manifestações clínicas da toxoplasmose. Porém, em 15 a 20% dos casos pode-se observar adenopatia, febre moderada e astenia (DUBEY, 1968; ODY, 1993). Estudos indicam que a taxa de contaminação do *T. gondii* em indivíduos normais é maior nas mulheres, e que a prevalência da sorologia positiva aumenta com a idade (RÖSE, 1997).

O protozoário participa como agente oportunista, em indivíduos imunodeprimidos. No grupo de risco incluem-se os pacientes transplantados, indivíduos em tratamento quimioterápico, portadores de HIV, indivíduos transfundidos, além de mulheres grávidas, pelo risco da transmissão transplacentária com as formas de taquizoítos (SOULIER, et al., 1991; ISRAELSKI & REMINGTON, 1993; MAYES, et al., 1995; CONTRERAS et al., 1996; RENOULT, et al., 1997). A atividade imunodepressora de corticóides e de agentes que atuam no mesmo sentido é capaz de fazer manifestar o oportunismo do parasita que, então, encontrará condições de maior suscetibilidade ou agirá danosamente a partir do estado de latência. Deste modo, a toxoplasmose vem apresentando quadro grave de evolução em indivíduos imunocomprometidos, causando encefalite, corioretinite ou doença disseminativa (LOWENBERG, et al., 1983; ARNOLD, et al., 1997). Nestes indivíduos via de regra, a toxoplasmose envolve a reativação da primoinfecção.

No caso da toxoplasmose congênita a gravidade das lesões depende da data da contaminação materna (DESMONTS & COUVREUR, 1986; HOHLFELD et al., 1994; PRATLONG et al., 1996). Havendo contaminação no primeiro trimestre da gestação, o risco de contaminação fetal é baixo, mas as lesões são mais importantes, levando à morte do feto ou à formação de focos necróticos, responsáveis por seqüelas importantes. Quando a infecção materna se dá no segundo trimestre a contaminação fetal é mais freqüente, mas as lesões são

menos graves, podendo ocorrer aborto espontâneo em 25% dos casos ou doença severa. No terceiro trimestre geralmente ocorre doença subclínica. Enfim, qualquer que seja a data da contaminação fetal, os cistos são formados nos tecidos e o risco de reagudização posterior é importante (ENGSTROM et al., 1991). Dados indicam que a cada 1000 crianças que nascem, uma apresenta infecção congênita (RÖSE, 1997).

Nos grupos de risco para a toxoplasmose incluem-se também as populações em risco ocupacional e/ou exposicional, que engloba os médicos veterinários, indivíduos que manipulam carne crua e os indivíduos portadores de animais domésticos. Porém, é importante ressaltar que a infecção por contato direto com gatos excretando oocistos é extremamente improvável e, como os oocistos devem esporular para serem infectantes, o contato com fezes frescas não é capaz de causar infecção, e a possibilidade de transmissão para os seres humanos pelo ato de tocar ou acariciar um gato é mínima (MARTINS & VIANA, 1998). É provável que o contato humano com os oocistos esporulados ocorra mais freqüentemente pela geofagia ou através da ingestão de água contaminada. Outra via de transmissão recentemente reconhecida é o contato com cães, devido ao comportamento de alguns deles de ingerir e rolar sobre fezes de gatos, talvez atraídos pelo cheiro forte. Este comportamento foi denominado xenosmofilia e possibilitaria a transmissão pelo contato com a pelagem de cães (MARTINS & VIANA, 1998).

*** Imunocomprometidos por terapia pós-transplante**

A possibilidade da substituição de um órgão irremediavelmente doente por um sadio foi sempre uma aspiração da terapêutica médica. No caso do rim, tentativas desta ordem datam do início desse século. Mas somente depois de 1955 essa possibilidade passou do terreno das aspirações para o da execução prática. O primeiro transplante renal da América Latina ocorreu na Universidade de São Paulo em 1965 (NEUMANN et al., 1997). Hoje temos no Brasil 106 centros que realizam transplantes, não só produzindo saúde, como também ciência. Na prática clínica, o transplante de órgão visa melhorar um déficit funcional.

O maior obstáculo foi vencer a "barreira imunológica". A menos que doador e receptor sejam geneticamente idênticos, os antígenos do enxerto são capazes de provocar uma resposta de rejeição imunológica. Um transplante pode estimular todos os mecanismos de imunidade celular e humoral, específicos e inespecíficos (ROITT, et al., 1998).

Todos os seres vivos têm marcadores imunológicos que determinam sua identidade

genética. Esses marcadores estão presentes em todas as células nucleadas do organismo e definem o próprio do não-próprio. Estes antígenos são designados no homem como HLA (*Human Leucocyte Antigen*). O Sistema HLA compreende antígenos de classe I, II e III. As moléculas de classe I são encontradas em todas as células nucleadas, são detectadas sorologicamente e muito úteis para a seleção de doadores vivos-relacionados. Nos rins estas moléculas estão presentes no endotélio de todos os vasos e túbulos renais. As moléculas de classe II estão presentes nas células envolvidas com a defesa, inclusive nos linfócitos B, e nos rins encontram-se presentes nos capilares intertubulares e no endotélio glomerular. As moléculas de classe III compreendem alguns componentes do sistema complemento. Além do sistema HLA, os transplantes renais são influenciados por três outros sistemas: ABO, Rh e Lewis. O primeiro, é de fundamental importância para o transplante renal já que é impossível executar transplantes com incompatibilidade ABO. O grupo de Lewis não impede o transplante, mas pode acarretar a diminuição da sobrevida no caso de incompatibilidade.

Pacientes submetidos à diálise e a transfusões repetidas vão se tornando sensibilizados aos antígenos HLA. Cerca de 20% da população dialítica está impossibilitada de se submeter ao transplante renal, a não ser que seja encontrado um doador com HLA idêntico.

Com o objetivo de prevenir a rejeição ao órgão transplantado ou contê-la se ela já estiver instalada, evitar infecções oportunistas e minimizar as outras toxicidades associadas com esses agentes, são usadas drogas com ação antiinflamatória que interferem na multiplicação celular e conseqüentemente linfocitária, denominadas imunossupressores. O avanço na manipulação da resposta imune com agentes químicos iniciou-se em 1951, com a utilização dos corticoesteróides. Estes são amplamente usados na imunossupressão clínica para manutenção e indução terapêutica (ABBAS et al., 2000) e com diferentes associações, pois os protocolos de imunossupressão utilizados são dependentes das características do receptor, do tipo de transplante e de sua evolução. Os principais imunossupressores utilizados são:

a) Ciclofosfamida: é uma droga anticancerígena com propriedades imunossupressoras, metabolizada por enzimas hepáticas em um produto final que impede a proliferação celular suprimindo a imunidade celular e humoral.

b) Azatioprina: é uma toxina metabólica usada em vários casos para manter a imunossupressão. Este agente inibe a maturação dos linfócitos a partir dos precursores e também destrói as células T maduras que foram estimuladas pelos aloantígenos e estão em

rápida proliferação (Figura 1). O emprego desta droga é limitado pela toxicidade (ABBAS et al, 2000). Antes da ciclosporina, a azatioprina era utilizada juntamente com os glicocorticóides para manter a imunossupressão, inibindo a síntese do DNA e com isso, a multiplicação celular. O emprego desta droga está associado com várias complicações e feitos colaterais, como a mielotoxicidade e as alterações gastrointestinais.

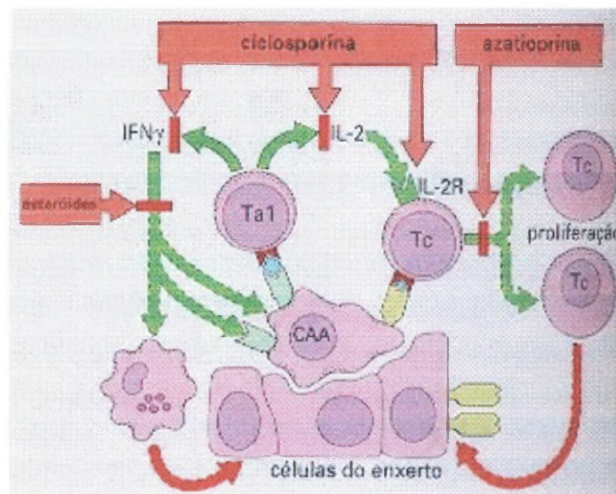


Figura 1. Agentes comumente utilizados na clínica (ciclosporina e azatioprina) para suprimir a resposta de rejeição em diferentes fases do transplante (ROITT et al., 1998).

c) Ciclosporina (CsA): é um macrolídeo fúngico, produzido por organismos do solo (Figura 2). Com a introdução deste agente, o índice de sobrevivência dos pacientes aumentou, pois esta droga possui um efeito inibidor seletivo aos linfócitos T. Seu mecanismo de ação ocorre através do bloqueio da interleucina-2 e em geral é acompanhada de uma queda do número de linfócitos TCD₄. A ciclosporina vem sendo utilizada no lugar da azatioprina e seu uso proporcionou uma melhora acentuada do prognóstico do enxerto no transplante de rim de cadáver. Além disso, a ciclosporina não tem efeito depressor sobre a medula, diminuindo, portanto, a ocorrência de infecção e, podendo dispensar a utilização de glicocorticóides, ou estar associada a uma pequena dose do mesmo. Estudos têm mostrado que a Ciclosporina A

pode também inibir o crescimento dos parasitas. *In vitro*, a replicação do *T. gondii* nos macrófagos de camundongos foi inibida pela ciclosporina. Entretanto, o efeito da Ciclosporina A *in vivo* não é totalmente claro (SMITH, 1997).

O CsA neoral com sua nova formulação permite uma rápida liberação da CsA no trato gastrointestinal, de modo a facilitar e permitir maior absorção.

d) FK506 (Tacrolimus): é um macrolídeo policlínico que inibe as vias bioquímicas intracelulares dependentes da presença do íon cálcio. É uma droga primária alternativa ao uso da CsA.

e) Rapamicina: é um macrolídeo com estrutura semelhante à da FK506. Não afeta a síntese de citocinas, mas atua impedindo a resposta a esses hormônios através do bloqueio do sinal de transdução gerado pelos receptores das citocinas. Os mecanismos moleculares de ação desta droga não são ainda completamente conhecidos, porém sabe-se que ela atua sobre as vias bioquímicas que estimulam a produção de linfocinas.

f) Ácido micofenólico (MMF): é uma droga semi-sintética que inibe de modo não-competitivo a IMP deidrogenase, que é uma enzima fundamental para a via da síntese de purinas.

g) Brequinar: é um derivado sintético, originalmente desenvolvido como uma droga anti-neoplásica. Atua inibindo a via da síntese das pirimidinas através da inibição da enzima diidro-orotato deidrogenase, não permitindo a formação dos nucleotídeos necessários para a síntese de RNA e DNA.

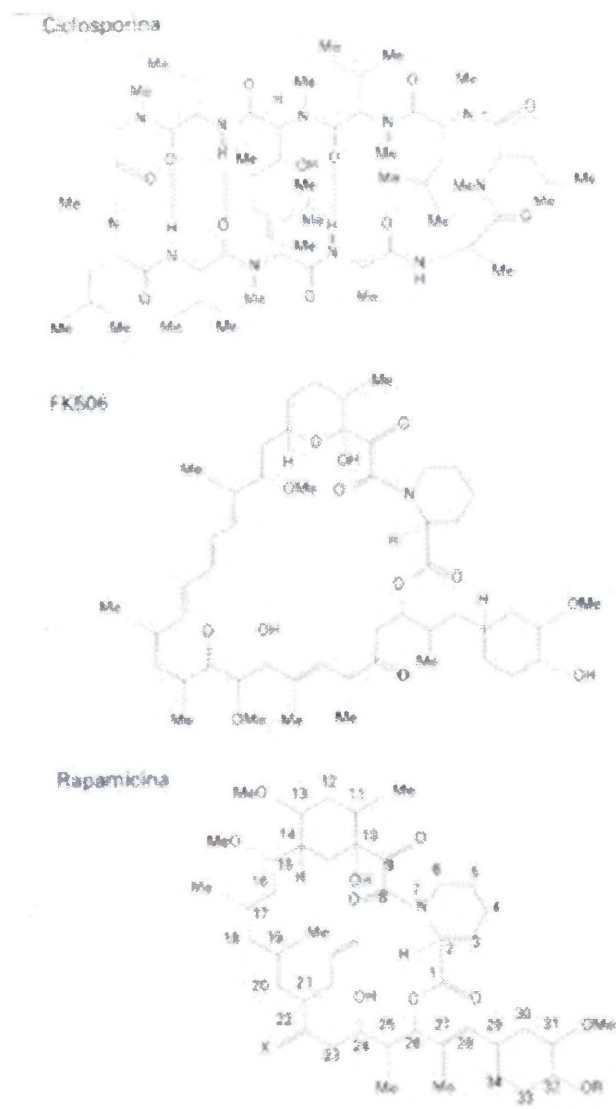


Figura 2. A estrutura de alguns agentes fúngicos imunossupressores (ROITT et al., 1998).

O início dos anos 90 foi marcado pelo aparecimento de várias moléculas naturais, semi-sintéticas ou totalmente sintéticas, que vieram contribuir com os agentes imunossupressivos tradicionais (Tabela 1). A cronologia do uso de imunossupressores nos transplantes está indicada na Figura 3.

Tabela 1. Mecanismo de ação dos agentes imunossupressores químicos (modificado de NEUMANN et al., 1997).

DROGA	LOCAL DE AÇÃO	MECANISMO DE AÇÃO
Ciclofosfamida	Alquilação do DNA	Bloqueia síntese de DNA
Azatioprina	Síntese de purinas	Bloqueia síntese de DNA
Ácido micofenólico (MMF)	IMP desidrogenase	Bloqueia síntese de DNA
Brequinar	Diidro-orotate desidrogenase	Bloqueia síntese de DNA
Ciclosporina	Calcineurina	Bloqueia ativação linfocitária
FK506	Calcineurina	Bloqueia ativação linfocitária
Glicocorticóides	Receptores de esteróides	Bloqueia ativação de células do Sistema Imunológico
Rapamicina	IMP desidrogenase	Bloqueia ativação linfocitária

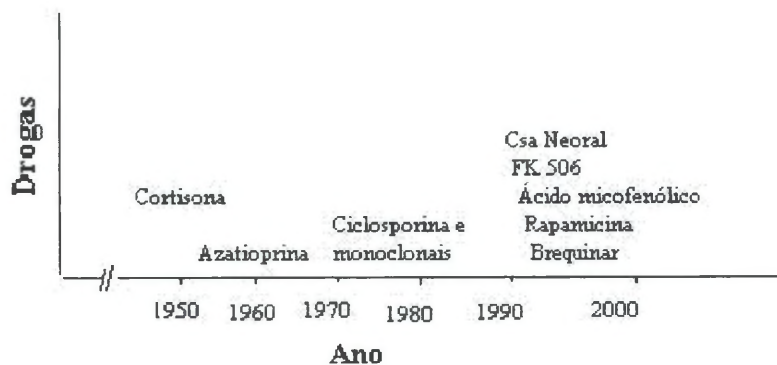


Figura 3. Cronologia dos descobrimentos e uso clínico dos agentes imunossupressores (adaptado de NEUMANN et al., 1997).

Estas drogas são utilizadas em várias combinações, pois estes agentes trabalham em sinergia, já que agem em diferentes estágios da mesma via imune. Assim, as doses dos agentes individuais podem ser reduzidas e os efeitos colaterais, minimizados (ROITT, et al., 1998).

Em um transplante renal, as complicações mais frequentes são a rejeição e as infecções. No Brasil, principalmente quatro tipos de infecções são constatadas: infecção grave

sistêmica por *Strongyloides stercoralis*, que hoje é controlada por terapêutica anti-helmíntica prévia ao transplante, Tuberculose, Citomegalovirose (causada pelo citomegalovírus -CMV) e doença de Chagas agudo.

Nos últimos anos outros agentes infecciosos têm se mostrado como problema para pacientes imunossuprimidos como o *Toxoplasma gondii*. Ocorreram vários relatos de toxoplasmose em pacientes transplantados renais. Na maioria dos casos, a infecção ocorreu três meses após o transplante, que é o período da máxima imunossupressão, e os pacientes foram a óbito. A toxoplasmose só foi constatada no exame pós-morte, que revelou a doença na sua forma disseminativa com cistos múltiplos de toxoplasma nos pulmões, fígado, miocárdio, pâncreas e principalmente no cérebro (RENOULT et al., 1997). O primeiro sintoma geralmente é a febre, seguida de leucopenia e trombocitopenia, e em casos mais graves, verificou-se pneumonia e distúrbios neurológicos. O tratamento em um paciente soropositivo dura geralmente dois meses e é realizado com: Pirimetamina, Sulfadiazina e Clindamicina (MORLAT & LEPORT, 1997; SMITH, 1997). A dosagem exata destas drogas ainda não é bem definida, mas sabe-se que elas não interagem com a ciclosporina nestes pacientes.

Em países onde a soroprevalência da toxoplasmose é alta, como na França (a taxa de positividade chega a 85% em indivíduos normais), estudos sorológicos para o *T. gondii* no potencial doador são obrigatórios, já que a doença resulta principalmente da reativação da infecção latente no receptor e no próprio órgão transplantado (RENOULT et al., 1997).

*** Imunocomprometidos por terapia anti-neoplásica**

Estudos mostram que a prevalência da toxoplasmose geralmente ocorre em pacientes que apresentam a doença de Hodgkin (Tabela 2). Entretanto, a infecção pelo *T. gondii* já foi descrita em pacientes com linfoma, linfossarcoma, sarcoma de células reticulares, leucemias agudas e crônicas, mielomas múltiplos, metaplasia mielóide e linfadenopatia angioimunoblástica (ISRAELSKI & REMINGTON, 1993; SMITH, 1997).

O linfoma de Hodgkin é a malignidade mais comumente associada com a toxoplasmose. Ela deriva de uma disfunção das células T, que, exacerbada pelo uso das terapias imunossupressoras, predispõe o paciente à toxoplasmose.

Em pacientes com câncer, a toxoplasmose geralmente ocorre pela reagudização da cepa latente, provavelmente pela ação das drogas imunossupressoras que são usadas no

tratamento das malignidades. Se não for tratada, a toxoplasmose nestes pacientes, pode ser fatal. O tratamento na maioria dos casos é feito com pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico. Porém, estudos com interferon- γ em animais, tem mostrado resultados efetivos no tratamento da toxoplasmose (ISRAELSKI & REMINGTON, 1993).

Tabela 2. Número de casos relatados de toxoplasmose na análise de 128 pacientes acometidos por diferentes neoplasias (traduzido de ISRAELSKI & REMINGTON, 1993).

NEOPLASIAS	NÚMERO DE CASOS RELATADOS DE TOXOPLASMOSE
Linfoma de Hodgkin	59
Linfoma de não-Hodgkin	12
Leucemia linfocítica aguda	11
Leucemia linfocítica crônica	6
Leucemia mielóide aguda	7
Leucemia mielóide crônica	9
Leucemia de célula-pilosa	3
Linfadenopatia angioimunoblástica	4
Mieloma	2
Câncer de mama	3
Tumor ovariano	2
Timoma	2
Carcinoma pulmonar	1
Seminoma	1
Melanoma	1
Síndrome mielodisplásica	1
Adenoma cromóforo	1
Neuroblastoma	1
Macroglobulinemia de Waldenstrom	1
Policitemia vera	1
TOTAL	128

Os pacientes acometidos por neoplasias recebem tratamento imunodepressivo constituído de corticoesteróides, agentes alquilantes, antimetabólitos e radioterapia e quimioterapia.

Estudo de ISRAELSKI & REMINGTON (1993) com 86 pacientes com câncer demonstrou que o sintoma mais comum nestes pacientes é a febre (62 pacientes tiveram

encefalite), seguida de linfadenopatia, sintomas neurológicos, miocardite e pneumonia. Estudos pós-morte evidenciam a disseminação da doença em todos os órgãos.

Vários estudos têm tentado correlacionar a coinfeção da toxoplasmose com outras infecções, principalmente o CMV (ISRAELSKI & REMINGTON, 1993; SMITH, 1997).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. REATIVOS E EQUIPAMENTOS

Todos os reativos estão listados em anexo.

- Leitor de ELISA TITERTEK multiscan MCC / 340P VERSÃO 2.20.
- Microscópio para Imunofluorescência: Fotomicroscópio Axiophot - ZEISS - Germany

4.1.2. AMOSTRAS DE SOROS

- **População de indivíduos imunocomprometidos por neoplasias**

Os soros para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* foram obtidos de indivíduos imunocomprometidos que deram entrada no laboratório Frischmann Aisengart de Curitiba e no Hospital das Clínicas da UFPR, que apresentavam marcadores para neoplasias.

- **População de indivíduos com risco ocupacional e/ou exposicional**

Os soros para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* foram obtidos pela farmacêutica Juliana Tracz Pereira por punção venosa, de médicos veterinários atuando no Estado do Paraná e estudantes dos cursos de Medicina Veterinária e Biologia da UFPR. A amostra foi delimitada pela adesão espontânea dos profissionais e estudantes.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOROS

Os soros foram obtidos por punção venosa, em vacuntainer. Após a coleta de aproximadamente 5ml de sangue, estes foram deixados em banho maria a 37°C por 3 a 4 horas para a separação do soro. O soro foi recuperado com pipeta, transferido para outro tubo e posteriormente submetido à centrifugação a 2000 rotações por minuto (rpm) durante 10

minutos. A seguir as amostras de soro foram identificadas e armazenadas, até sua utilização, a 30°C negativos.

4.2.2. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO PARA MÉTODO DE ELISA

O antígeno foi produzido no laboratório, utilizando a cepa de *T. gondii* Rh padrão, a partir de lavado peritoneal de camundongos *Mus musculus* previamente inoculados. A cepa foi cedida gentilmente pelo Professor Dr. Odilon Vidotto do Departamento de Parasitologia da Universidade Estadual de Londrina.

PROCEDIMENTO:

- 1) Centrifugar a 3000 rpm, a 4°C, por 30 minutos
- 2) Desprezar o sobrenadante e adicionar soro fisiológico a 0,3%
- 3) Centrifugar a 2500 rpm, a 4°C, por 15 minutos
- 4) Desprezar o sobrenadante e adicionar solução tampão PBS - pH7,2
- 5) Centrifugar a 3500 rpm, a 4°C, por 30 minutos
- 6) Congelar em temperatura -20°C, no caso da não utilização imediata
- 7) Adicionar água destilada menos da metade do volume do sedimento
- 8) Congelar em nitrogênio líquido por 05 minutos
- 9) Descongelar imediatamente a 37°C
- 10) Repetir os itens 9 e 10 cinco vezes
- 11) Submeter o antígeno ao ultra-som (20KHz - 1mA; 80 ciclos por minuto), efetuando 05 séries de 30 segundos com intervalos de um minuto (conservado no gelo)
- 12) Centrifugar o antígeno a 15000 rpm, a 4°C, por 30 minutos e recuperar o sobrenadante
- 13) Se houver sedimento, repetir os itens 2 a 6
- 14) Filtrar em milipore e determinar a concentração de proteínas
- 15) Guardar o antígeno em pequenas alíquotas em tubos plásticos a -70°C

* DOSAGEM DE PROTEÍNAS

PROCEDIMENTO:

- 1- Preparar o reagente A:
 - ❖ 2ml de tartarato de sódio e potássio a 4%
 - ❖ 2ml de sulfato de cobre a 2%
 - ❖ diluir em 100ml de carbonato de sódio a 3% em NaOH 0,1N. Aguardar 10 minutos em temperatura ambiente.
- 2- Preparar o reagente B:
 - ❖ 1 volume do Reagente de Folin
 - ❖ 2 volumes de água destilada
- 3- Adicionar a água destilada em cada tubo e a seguir o padrão de soroalbumina bovina (BSA) e a amostra (em duplicata)
- 4- Homogeneizar em vortex
- 5- Adicionar o reagente A, homogeneizar em vortex e aguardar 10 minutos
- 6- Adicionar o reagente B, homogeneizar em vortex e aguardar 10 minutos
- 7- Proceder a leitura em espectrofotômetro em 660nm imediatamente
- 8- Anotar as absorbâncias com as seguintes diluições: os tubos de 1 a 6 são as amostras em 25, 50 e 100 μ l, em duplicata. Os tubos de 07 a 10 são as soluções padrão de soroalbumina bovina na concentração de 2mg/ml, nas quantidades de 25 e 50 μ l, em duplicata. O tubo n.º 11 é o branco controle.

4.2.3. TESTE DE ELISA COMO IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

* PRODUÇÃO DE ANTÍGENO

O antígeno de *Toxoplasma gondii* foi produzido conforme descrito no item produção de antígeno (4.2.2), através da cepa RH padrão. O antígeno utilizado é solúvel e está em fase sólida.

* PRODUÇÃO DO CONJUGADO

O conjugado utilizado no presente trabalho foi anti-IgG humana produzida em carneiros, conjugada com a enzima peroxidase. O conjugado foi produzido na Fundação Esequiel Dias (FUNED), e gentilmente cedido pelo professor Dr. Carlos Chávez Olórtégui.

* CONDIÇÕES GERAIS DO TESTE DE ELISA

O princípio da técnica de ELISA é uma reação de cor. A coloração faz-se presente quando a enzima peroxidase, integrante do conjugado, desdobra o substrato ortofenilenodiamino (OPD). Para que haja manifestação de cor, é necessário que ocorram uma série de eventos em seqüência. Estes eventos têm início com a sensibilização da placa com o antígeno solúvel e seguem até a aferição da cor pelo leitor de ELISA (figura 4).



Figura 4. Determinação de anticorpos pelo método de ELISA Indireto (adaptado de KUBY, 1995).

* PROTOCOLO PARA PROVA DE ELISA

Para a realização da prova de ELISA foram seguidas as etapas descritas abaixo:

- Sensibilizar a placa com antígeno
- Armazenar a placa a 4°C *over night* ou a 37°C por 3 horas

- c) Lavar a placa com solução de lavagem (02 vezes)
- d) Bloquear a placa com solução bloqueio
- e) Incubar a placa em estufa a 37°C por 60 minutos
- f) Lavar a placa com solução de lavagem (02 vezes)
- g) Adicionar as amostras de soro
- h) Incubar a placa em estufa a 37°C por 60 minutos
- i) Lavar a placa com solução de lavagem (06 vezes)
- j) Adicionar o conjugado
- l) Incubar a placa em estufa a 37°C por 60 minutos
- m) Lavar a placa com solução de lavagem (06 vezes)
- n) Adicionar o substrato
- o) Armazenar a placa em local escuro por 15 minutos
- p) Interromper a reação com ácido sulfúrico
- q) Realizar a leitura (figura 5)

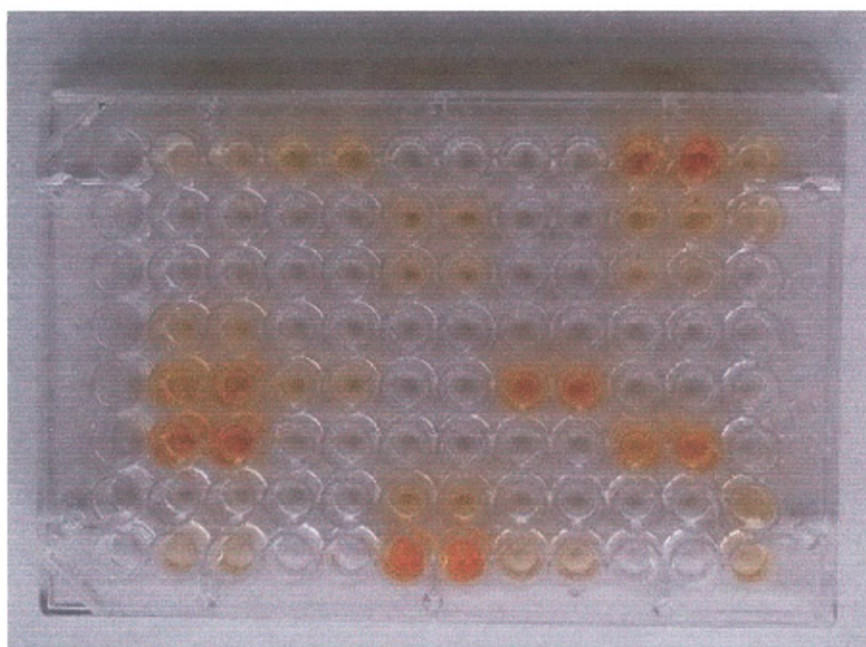


Figura 5. Placa de ELISA mostrando reações de cor (amarela) que indicam reações positivas.

* SENSIBILIZAÇÃO DA PLACA

Sensibilização é o processo de fixação, neste caso, do antígeno na placa.

A concentração protéica de antígeno determina a concentração de antígeno a ser utilizada na sensibilização da placa. O antígeno em questão foi utilizado em duas concentrações buscando estabelecer a melhor. Inicialmente utilizou-se a concentração de 150 ng/well e posteriormente a de 300ng/well. Conforme a concentração protéica, dilui-se o antígeno em solução de *coating buffer* ou tampão de incubação (anexo). Com a utilização de pipetas faz-se a distribuição da solução antigênica na placa. São pipetados 100µl da solução de antígeno por poço, exceto na primeira coluna (branco). A placa sensibilizada é armazenada na geladeira *over-night*. Nesta, e nas etapas seguintes, a placa é protegida durante o período de incubação por uma tampa plástica.

Foram utilizadas neste trabalho placas de poliestireno Corning-Sigma, constituídas de 96 wells (12 colunas com 08 wells em cada).

* PRIMEIRA LAVAGEM

Tem a finalidade de remover o antígeno que não se fixou na placa. Utiliza-se a solução de lavagem (0,05% Tween-salina). Os wells são completamente preenchidos com a solução de lavagem. Na seqüência, remove-se o conteúdo. Esta operação é realizada duas vezes.

* BLOQUEIO DA PLACA

A placa é bloqueada com 100 µl de solução de bloqueio por well. Incuba-se a placa em estufa a 37°C por 60 minutos. O bloqueio tem a finalidade de ocupar espaços em branco deixados nos wells da placa no processo de sensibilização.

* SEGUNDA LAVAGEM

A finalidade desta lavagem é remover proteínas da solução de bloqueio que não se fixaram na placa. Procede-se de forma semelhante à primeira lavagem. A operação é realizada duas vezes.

* DILUIÇÃO DOS SOROS

Os soros foram diluídos em tampão de incubação. Foram realizadas diferentes diluições buscando estabelecer a melhor concentração. Utilizou-se as diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600. Em cada *well* colocou-se 100µl de soro diluído. Na primeira coluna da placa não foram colocadas amostras de soro. Depois da distribuição das amostras de soro na placa, a mesma foi incubada em estufa a 37°C por 60 minutos. A finalidade desta etapa é fazer a ligação do antígeno, fixado na placa, com anticorpos específicos presentes no soro de cães com toxoplasmose.

* TERCEIRA LAVAGEM

Esta lavagem destina-se a remover anticorpos que não estão ligados aos antígenos fixados na placa, bem como outras substâncias presentes no soro. Esta lavagem é mais rigorosa que as anteriores, pois se pequenos resíduos permanecerem nos *wells*, o resultado poderá se alterar significativamente. Por isso, este processo é repetido seis vezes.

* DILUIÇÃO DO CONJUGADO

De forma semelhante ao soro, o conjugado foi diluído em tampão de incubação. Foram utilizadas duas diluições do conjugado - 1:500 e 1:1000. Foram distribuídos 100µl de conjugado diluído em cada *well*, exceto na primeira coluna da placa (branco). Depois da distribuição do conjugado na placa, a mesma é incubada em estufa a 37°C por 60 minutos.

* QUARTA LAVAGEM

Esta lavagem tem a finalidade de remover todo o conjugado que não estiver ligado a moléculas de anticorpos nos poços da placa. Qualquer resíduo do conjugado alterará completamente os valores da reação.

* SUBSTRATO

A atividade enzimática é revelada utilizando-se como substrato a solução de ortofenilenodiamino (OPD). O OPD é a substância na qual a enzima peroxidase vai atuar, resultando na formação de cor. Utiliza-se H_2O_2 como catalisador e tampão citrato pH 5,0 como veículo. Em cada poço são colocados 100 μ l da solução contendo 20 μ g de OPD. Para preparar a solução, pipeta-se 10ml de tampão citrato e adiciona-se uma pastilha de OPD e 2 μ l de H_2O_2 . Distribuem-se 100 μ l de solução por poço. A seguir, a placa é incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

* INTERRUPÇÃO DA REAÇÃO

Para manter uniformidade de tempo de reatividade enzima-substrato, após 15 minutos de incubação, a reação é interrompida através da adição de 50 μ l de solução de H_2SO_4 a 2% em todos os poços da placa. A partir desse momento, a enzima peroxidase deixa de atuar sobre o substrato, podendo ser realizada a leitura.

* LEITURA

As leituras das placas de ELISA foram realizadas em um leitor de ELISA, com filtro de 492nm. O leitor deve ser ligado no mínimo 10 minutos antes da leitura ser realizada para a autocalibração do aparelho.

A leitura é feita logo após a interrupção da reação.

4.2.4. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO PARA MÉTODO DE IFI

O antígeno foi obtido de exsudato peritoneal de camundongos infectados com a mesma cepa de *T. gondii* utilizada para ELISA. O lavado passou por três lavagens com solução salina tamponada 0,01M pH 7,2 (PBS) sob centrifugação a 2600 rpm/10 minutos e conservados a temperatura de 4° a 8°C.

4.2.5. TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COMO DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

* ANTÍGENO

O antígeno *Toxoplasma gondii*, para o método de IFI, foi obtido conforme descrito no item produção do antígeno (3.2.4.).

* CONJUGADO

O conjugado utilizado no presente trabalho foi anti-IgG humana marcada com fluoresceína, e gentilmente cedido pelo Dr. Henrique Lerner (Laboratório Frischmann Aisengart).

* CONDIÇÕES GERAIS DO TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

Este teste utiliza taquizoítos liofilizados e fixados em uma lâmina. Sobre os antígenos fixados, são adicionadas diferentes diluições de soros. Após lavagem da lâmina, a fixação dos anticorpos específicos é revelada por meio de uma antiglobulina marcada com fluoresceína (absorve luz azul - 490nm – e emite uma intensa fluorescência amarelo-verde), que promove reação fluorescente (figura 6).

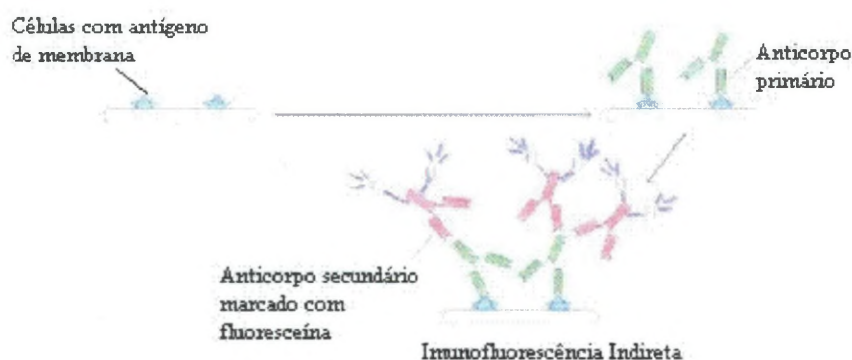


Figura 6. Imunofluorescência Indireta (adaptado de KUBY, 1995).

* PROTOCOLO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

1. Sensibilizar a lâmina para imunofluorescência com antígeno previamente diluído:
 - diluir o antígeno em 1ml de água destilada;
 - depositar 20 μ l do antígeno em cada *spot* da lâmina;
 - deixar o antígeno sedimentar durante 15 minutos antes de armazenar as lâminas na estufa;
 - armazenar as lâminas na estufa a 37°C por aproximadamente 2 horas;
 - retirar as lâminas da estufa;
2. Armazenar em congelador a - 20°C por 12 horas;
3. Retirar a lâmina do congelador;
4. Secar as lâminas 5 a 10 minutos com ventilador na potência máxima;
5. Depositar as lâminas em posição vertical em banho de acetona por 5 a 10 minutos, para fixar;
6. Retirar as lâminas do banho e depositá-las na estante;
7. Secá-las com ventilador na potência máxima;
8. Diluir os soros:
 - colocar os tubos de vidro na estante face a cada soro a ser testado;
 - numerar o tubo e escrever na folha de leitura o número correspondente do soro a ser testado;
 - distribuir 1ml de PBS por tubo;
 - retirar 50 μ l de PBS de cada tubo;
 - acrescentar a cada tubo 50 μ l do soro correspondente a ser testado (diluição 1/ 32);
9. Continuar a diluição em placa de ELISA:
 - escrever na frente de cada letra da placa o código do soro a ser testado;
 - colocar 50 μ l de PBS a partir da segunda fileira de *spots* da placa;
 - depositar 100 μ l de cada soro a ser examinado, na diluição de 1/32, na primeira fileira da placa;
 - retirar 50 μ l dos soros da primeira fileira e depositar nos *spots* da segunda fileira (diluição 1/64);
 - retirar 50 μ l dos soros da segunda fileira e depositar nos *spots* da terceira fileira (diluição 1/128) e assim sucessivamente até chegar a diluição máxima desejada;

10. Numerar cada lâmina conforme o soro que será depositado:
 - utilizar o lado correto da lâmina;
11. Depositar 25µl de cada diluição dos soros na lâmina:
 - Começar pela diluição mais fraca seguindo para as mais fortes;
12. Preparar uma câmara úmida com suporte para as lâminas;
13. Colocar as lâminas na câmara úmida recobrir com tampa;
14. Levar à estufa, a 37°C por 30 minutos;
15. Retirar as lâminas da estufa;
16. Colocá-las em banho de PBS por 10 minutos;
17. Enxaguá-las com pissete de água destilada:
 - pegar as lâminas pela parte polida;
 - retirar o excesso de água agitando suavemente;
18. Secá-las com ventilador na potência máxima;
19. Preparar o corante Azul de Evans:
 - colocar 50ml de PBS em um Beaker;
 - retirar 0,5ml e colocar 0,5ml de solução mãe de Azul de Evans;
20. Preparar uma diluição 1/100 de fluolina (conjugado com fluoresceína):
 - colocar 10µl de fluolina em 1ml de Azul de Evans diluído;
21. Colocar 25µl da fluolina diluída em cada *spot*, cuidando para não encostar a ponteira no “tapete de taquizoitos”;
22. Colocar as lâminas em uma câmara úmida e incubar a 37°C por 30 minutos;
23. Retirar as lâminas da estufa;
24. Lavá-las com PBS e secá-las com ventilador;
25. Preparar a solução de glicerina:
 - 72ml de glicerina em 8 ml de PBS;
26. Depositar a solução de glicerina entre as fileiras das placas;
27. Colocar lamínula em cada lâmina;
28. Realizar a leitura em Fotomicroscópio.

4.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Testes para avaliação da Sensibilidade (S) e Especificidade (E):

$$S = \frac{a}{a+c} \times 100$$

$$E = \frac{b}{b+d} \times 100$$

Onde,

a = número de soros positivos nos dois testes;

b = número de soros negativos nos dois testes;

c = número de soros negativos em ELISA e positivos em IFI;

d = número de soros positivos em ELISA e negativos em IFI;

4.2.7. LEVANTAMENTO DE PRONTUÁRIOS DE PACIENTES IMUNODEPRIMIDOS POR TERAPIA IMUNOSUPRESSORA

O levantamento de prontuários foi realizado no Hospital Evangélico de Curitiba, com 470 pacientes submetidos à transplante de rim, sob orientação da Dr.^a Fabiana de Carvalho Contieri e do Dr. Ricardo Benvenuto e colaboração da acadêmica Andréa Thomaz Soccol. O prontuário de cada paciente era analisado e suas informações passadas para um protocolo previamente preparado. O protocolo era constituído de informações básicas de identificação do paciente e informações pertinentes aos exames sorológicos e estudo clínico.

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

N.º da ficha:

Sexo: ___M ___F

Idade:

Profissão:

Tipo sanguíneo:

Doador: cadáver _____ vivo relacionado _____ vivo não-relacionado _____

Tempo de diagnóstico da doença:

Data do transplante:

Diálise: sim _____ não _____ data:

Transfusão: sim _____ não _____

Quantidade:

EXAMES SOROLÓGICOS**TOXOPLASMOSE (*Toxoplasma gondii*)**

❖ pré-transplante:

data:

Imunoglobulinas pesquisadas: IgG-

Título

IgM-

Título

❖ pós-transplante:

data:

Imunoglobulinas pesquisadas: IgG-

Título

IgM-

Título

❖ 2º pós-transplante:

data:

Imunoglobulinas pesquisadas: IgG-

Título

IgM-

Título

Tipo de exame: _____

DOENÇA DE CHAGAS (*T. cruzi*)

❖ pré-transplante:

data:

❖ pós-transplante:

data:

❖ 2º pós-transplante:

data:

Tipo de exame: _____

CITOMEGALOVIRUS

❖ pré-transplante:

data:

Imunoglobulinas pesquisadas: IgG-

Título

IgM-

Título

❖ pós-transplante: data:
 Imunoglobulinas pesquisadas: IgG- Título
 IgM- Título
 ❖ 2º pós-transplante: data:
 Imunoglobulinas pesquisadas: IgG- Título
 IgM- Título
 ❖ 3º pós-transplante: data:
 Imunoglobulinas pesquisadas: IgG- Título
 IgM- Título

Tipo de exame: _____

EXAMES CLÍNICOS

❖ pré-transplante: Leucócitos Totais _____ data:
 ❖ pós transplante:

LEUCÓCITOS TOTAIS		IMUNOSSUPRESSORES		
Data	Contagem	Azatioprina	Prednisona	CsA AM / PM

EXAME DE FEZES

❖ pré-transplante
 Método utilizado: data
 Resultado: positivo _____ negativo _____

❖ pós-transplante
 Método utilizado: data
 Resultado: positivo _____ negativo _____

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELISA

- PADRONIZAÇÃO DO ANTÍGENO

Para padronizar a concentração protéica do antígeno de *Toxoplasma gondii*, produzido conforme descrito no item produção de antígeno (3.2.2), este foi submetido à técnica de crioextração de proteína. Esta técnica consiste no descongelamento e congelamento da solução de antígeno três vezes consecutivas. A cada etapa a solução é agitada em vortex por 30 segundos. A leitura foi realizada no espectrofotômetro em 660nm de absorvância. O antígeno apresentou uma concentração protéica de 1,732mg/ml.

Foram testadas duas concentrações de antígeno, 150 e 300ng/*well*. Tendo em vista que os resultados obtidos com 300ng de antígeno por *well* alcançaram valores muito próximos ao valor máximo lido pelo aparelho (2,0 unidades de absorvância em 492nm) e que com 150ng de antígeno pôde-se chegar a valores satisfatórios de densidade óptica utilizando-se menor quantidade de material, optou-se pela concentração antigênica de 150ng/*well*.

- DILUIÇÃO DOS SOROS

A fim de descobrir a diluição ideal, fez-se diluições dos soros 1:100, 1:200, e assim sucessivamente até 1:1600. Foram utilizados soros comprovadamente positivos e comprovadamente negativo. Os soros controles foram gentilmente cedidos pelo Laboratório Frischmann Aisengart de Curitiba.

Observou-se que as médias dos valores de absorvância dos soros positivos obtidas na diluição 1:100 tiveram boa discriminação dos soros positivos e negativos, razão pela qual optou-se por utilizar esta diluição para a continuidade do trabalho. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, com a intenção de minimizar erros na pipetagem do material, e o valor final é a média dos dois resultados em densidade óptica (nm).

- DILUIÇÃO DO CONJUGADO

Foram realizadas diluições do conjugado 1:1000, 1:2000, 1:5000, e assim sucessivamente até 1:100000. Observou-se que a melhor discriminação dos valores de absorbância dos soros positivos e negativos foi obtido na diluição 1:10000, razão pela qual optou-se por utilizar a diluição do conjugado 1:10000 para a continuidade do trabalho.

- *CUT-OFF*

Os testes imunológicos podem ser apenas qualitativos (desencadear um sinal) ou também quantitativos, que se exprime em um título. Define-se como título de uma solução (soro, líquido cefalorraquidiano, sangue ou outros fluidos) a maior diluição da mesma capaz de desencadear o sinal de positividade. Esta diluição corresponde ao “ponto de viragem” ou *end point* da reação.

A escolha do *cut-off* ou ponto de corte, situação de discriminar doentes de não doentes, dependerá dos objetivos a que o teste se destina. Quando desejamos identificar todos os indivíduos portadores da doença pesquisada, usamos o *cut-off* com a sensibilidade máxima e especificidade reduzida, ciente neste caso, que existirá uma porcentagem significativa de falsos positivos. Quando o objetivo é o diagnóstico clínico deve-se usar um *cut-off* com especificidade máxima, mesmo que para isso tenha sensibilidade reduzida.

O resultado de um teste sorológico tem valor diagnóstico de probabilidade, ou seja, a probabilidade de que um resultado considerado positivo corresponda à doença é maior quanto mais alto for o título. Inversamente, para um resultado negativo, a probabilidade de não corresponder à doença é maior quanto mais baixo for o título.

Depois de padronizadas a concentração de antígeno, a diluição dos soros e a diluição do conjugado, iniciaram-se os ensaios para estabelecer o *cut-off*.

Para determinar o valor do *cut-off* foram utilizadas nove amostras de soros controle negativo. Todos os soros utilizados foram diluídos na proporção de 1:100 vezes. O antígeno foi utilizado na concentração de 150ng por *well* e o conjugado foi utilizado na diluição de 1:10000 vezes.

Para determinar o *cut off* foi calculada a média das densidades ópticas (D.O.) dos soros controles negativos (a). A este valor foi acrescido o fator de correção (b), estabelecendo-se

cut-off para indivíduos com título de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (c). Acrescendo-se duas vezes o fator de correção à média, estabelecemos o *cut-off* para indivíduos portadores de infecção aguda (d).

a) média = 0,0256 D.O.

b) fator de correção = 2,5

MÉDIA x 2,5 = CUT-OFF

c) *cut-off* 1 = **0,064 D.O.**

d) *cut-off* 2 = 0,1625 D.O.

5.2. COMPARAÇÃO DE EFICIÊNCIA ENTRE AS TÉCNICAS DE ELISA E IFI

Para comparação entre as duas técnicas (ELISA e IFI) foram analisados 102 soros (anexo 4). Para IFI os soros foram diluídos na proporção de 1/32, 1/64 e 1/128 e para ELISA os valores foram dados em densidade óptica (nm). O valor de referência para analisar a positividade ou a negatividade das amostras em IFI foi a diluição 1:64. Este valor de referência foi padronizado pelo Laboratório Frischmann Aisengart de acordo com o conjugado utilizado, para análise de anticorpos IgG nas amostras.

Os soros com valores muito próximos ao *cut-off* e que foram considerados na faixa cinza pelo teste de ELISA, apresentaram titulação em pelo menos uma diluição do teste de Imunofluorescência Indireta. Tanto o método de ELISA quanto o de IFI pesquisaram a presença de IgG nos soros estudados. Porém, as valores finais encontrados nas utilização das duas técnicas apresentaram uma pequena discrepância. Das 102 amostras analisadas, 15 (14,7%) soros foram positivos na técnica de IFI e 13 (12,7%) amostras positivas na ELISA (Tabela 3).

A diferença entre os resultados obtidos pelas técnicas de ELISA e IFI pode estar relacionada aos diferentes antígenos utilizados, uma vez que na técnica de IFI utilizou-se parasitas íntegros (antígenos de membrana que estimulam a produção de anticorpos mais precocemente na infecção), enquanto que no método de ELISA utilizou-se antígenos solúveis (citoplasmáticos), cujos anticorpos seriam formados mais tardiamente na infecção. Segundo VAN KNAPEN (1984), o fato de soros não-reagentes pela técnica de ELISA serem reagentes por outros métodos sorológicos clássicos, pode estar relacionado a maior especificidade,

menor sensibilidade, diferentes antígenos e a qualidade do conjugado utilizado nos testes. Além disso, nos estudos de VAN KNAPEN (1884), o uso do OPD na revelação das placas gerou densidades ópticas maiores, embora a discriminação entre amostras com maior e menor positividade se tornasse de difícil observação principalmente por leitura visual. No nosso trabalho, o substrato utilizado para revelação das reações de cor foi o OPD, mas toda leitura de placa foi processada em Leitor automático de ELISA, a fim de que fossem minimizadas estas diferenças.

A sensibilidade e especificidade da comparação entre os dois testes utilizados foi obtida através de análise estatística.

Tabela 3. Resultados obtidos na utilização das técnicas de ELISA e IFI

NÚMERO DE SOROS	TÍTULO DE ANTICORPOS ANTI- <i>Toxoplasma</i> (IFI)			VALOR DE ABSORBÂNCIA ÓPTICA (ELISA)		
	(+) 1:64	(-) 1:64	(±) 1:64	acima de	entre 0,001-	entre 0,059-
				0,069nm	0,058nm	0,068nm
10	87	5	13	88	1	

5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Testes para avaliação de Sensibilidade e Especificidade foram realizados no tratamento dos resultados obtidos através das técnicas sorológicas. Para a avaliação estabeleceu-se o uso de 102 amostras.

Os resultados da comparação entre os dois testes mostraram um percentual de equivalência de 98,9% de Especificidade e 80,0% de Sensibilidade.

$$S = \frac{12}{12 + 3} \times 100 = 80,0\%$$

$$E = \frac{86}{86 + 1} \times 100 = 98,9\%$$

Estes resultados validam as técnicas de ELISA e IFI como métodos diagnósticos da toxoplasmose.

Vários autores têm utilizado estas duas técnicas no diagnóstico da toxoplasmose. Estudo realizado por UCHÔA et al (1999) com 103 soros, obteve uma concordância bruta entre os dois testes de 88,3%, IgG sensibilidade de 96,7% e especificidade de 75%. CAMARGO et al (1986) utilizando a técnica de ELISA para IgG anti-*T. gondii* também encontraram boa correlação da ELISA-IgG com o teste de IFI-IgG.

VAN KNAPEN (1984) sugere que o teste de ELISA pode ter boa aplicabilidade no diagnóstico da toxoplasmose em testes de triagem sorológica (identificação de soros positivos e negativos), o que também foi evidenciado em nosso estudo, à partir da análise dos valores de copositividade e conegatividade entre as técnicas de IFI e ELISA.

5.4. ESTUDO DA INCIDÊNCIA/PREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

O estudo epidemiológico da toxoplasmose em pacientes imunodeprimidos por terapia pós-transplante renal foi realizado com a utilização dos prontuários destes pacientes.

O cadastramento destes indivíduos ocorre diretamente no Hospital Evangélico de Curitiba, e estes ficam em uma lista de espera de um possível doador. Após a notificação da existência do potencial doador à CET (Central de Transplantes), a equipe da UTI ou a própria CET entra em contato com a equipe de captação do rim do hospital, que será a equipe coordenadora da retirada. A equipe captadora que coordenará a retirada de órgãos providenciará:

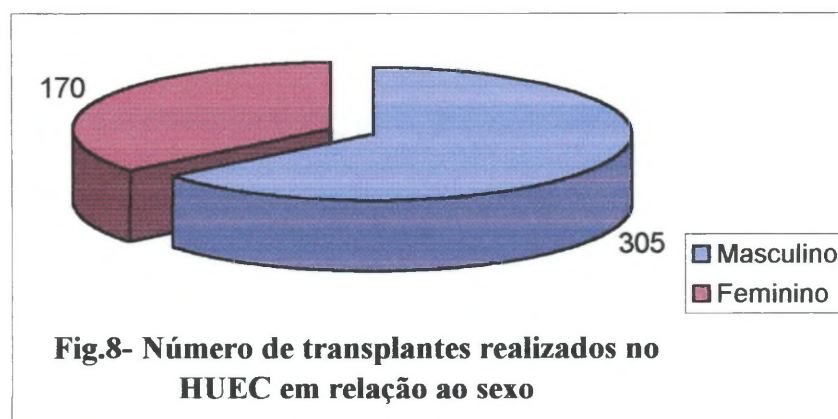
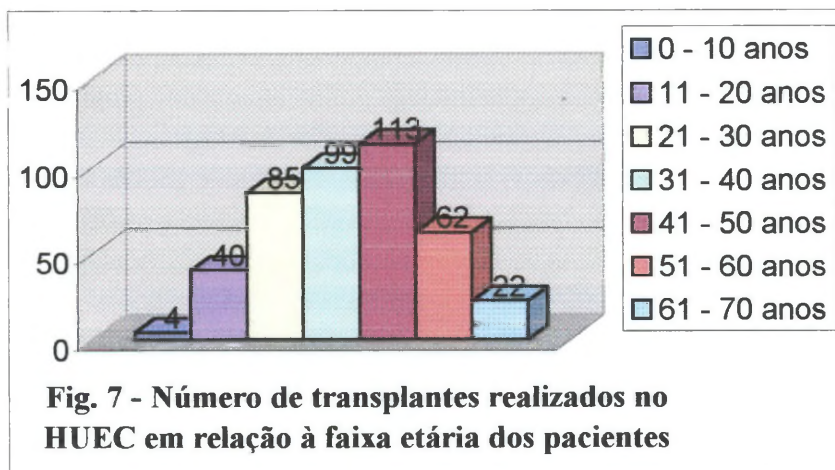
- 1- avaliação clínica do potencial doador para verificação dos requisitos clínicos para doação;
- 2- exames laboratoriais de tipagem ABO;
- 3- averiguação do diagnóstico de morte encefálica atestada no prontuário;
- 4- manutenção clínica do doador;
- 5- contato com a família do doador para obtenção do termo de doação de órgãos e tecidos;

6- encaminhamento do soro do doador para o laboratório clínico para realização das sorologias pertinentes: toxoplasmose, doença de Chagas, Citomegalovírus, HIV, HCV, HbsAg e VDRL;

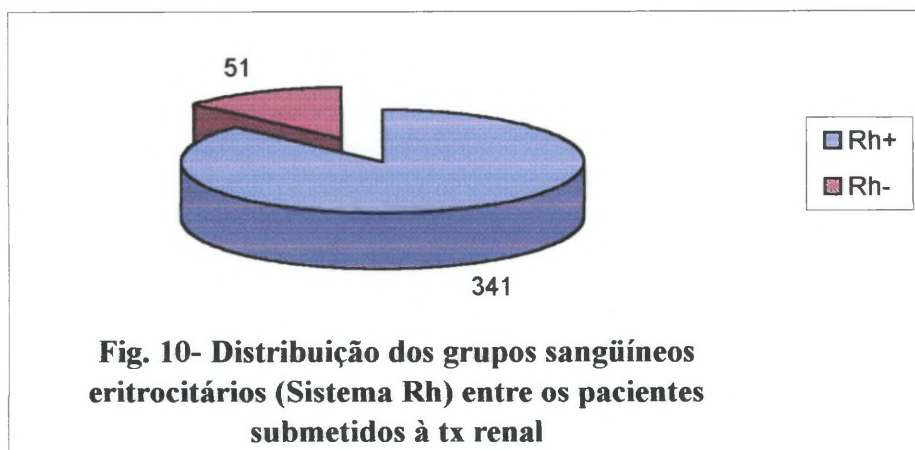
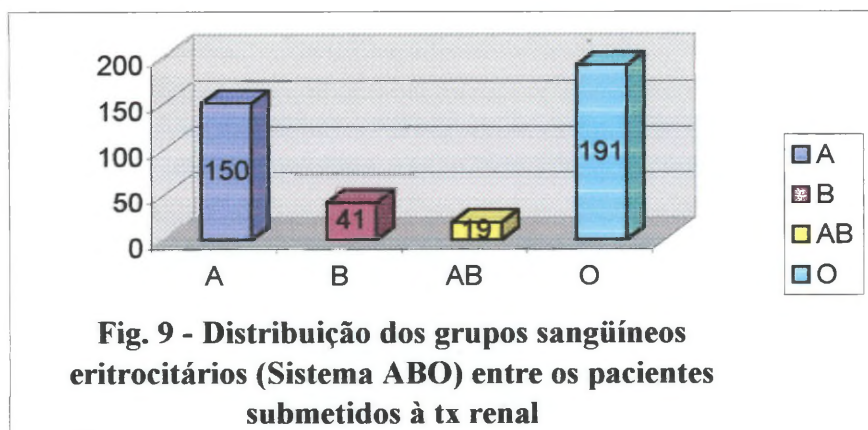
7- encaminhamento do soro, linfonodos, e sangue periférico heparinizado do doador para o laboratório de histocompatibilidade para realização de tipagem HLA e prova cruzada (crossmatch).

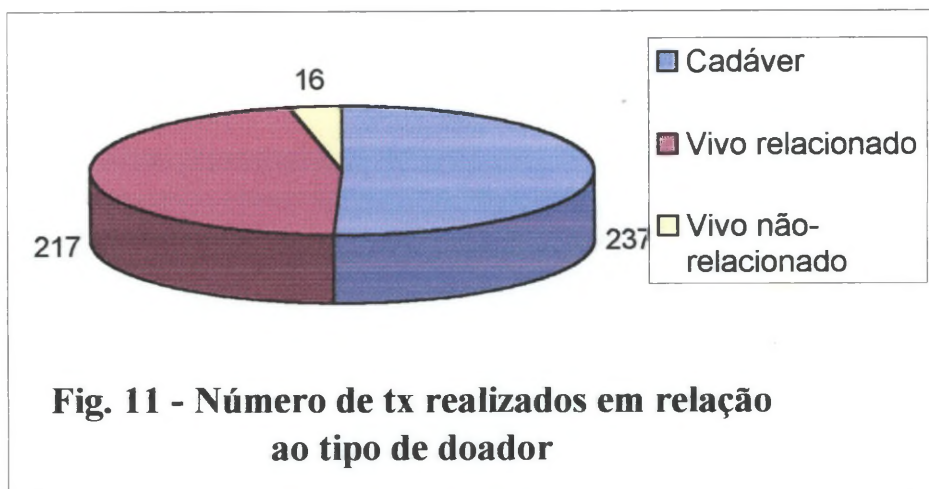
O transplante renal é indicado aos pacientes com insuficiência renal crônica terminal, *Diabetes mellitus*, doença renal hipertensiva e glomerulonefrite, na faixa etária entre 01 a 65 anos, desde que não sejam portadoras de doenças neoplásicas, HIV, nem de processos cardiovasculares sintomáticos. Porém, a maior prevalência de transplantes ocorre na faixa etária entre 21 a 50 anos, mas são realizados transplantes em pacientes de todas as idades (figura 7).

Os pacientes transplantados foram submetidos a um esquema de imunossupressão constituído de Azatioprina, Prednisona, Metilprednisolona, Ciclosporina, Ciclosporina microemulsão (neoral), FK506 e Micofenolato Mofetil (MMF), conforme evolução na área terapêutica, disponibilidade dos fabricantes e, principalmente, da resposta do paciente. O protocolo de imunossupressão é constituído geralmente de dois ou três agentes, e as drogas mais utilizadas foram primeiramente azatioprina, prednisona, e ciclosporina que algumas vezes eram acompanhadas da metilprednisona, quando se necessitava de uma atividade imunossupressora mais ampla. Com o aparecimento da ciclosporina neoral, FK506 e da MMF (mofetilmicofenolato), a azatioprina passou a ser substituída por estes medicamentos, mas esta substituição só aconteceu em transplantes realizados a partir de 1998 (CONTIERI & BENVENUTI, comunicação pessoal).



A figura 8 mostra o percentual de transplantes realizados em relação ao sexo dos pacientes, mostrando um índice superior de transplantes realizados em indivíduos do sexo masculino. Porém, este valor ocorre ao acaso, já que não existem diferenças entre os sexos para a realização de um transplante. Com relação ao tipo sanguíneo (Sistema ABO e Rhesus), verifica-se maior prevalência de transplantes em indivíduos O Rh+ (Figuras 9 e 10), evidenciando a maior frequência deste tipo sanguíneo na população em geral.





Quanto ao doador, estes podem ser: doador vivo-relacionado (mãe, pai, irmãos, parentes), doador vivo não-relacionado (cônjuge) e doador cadáver (Figura 11). A maioria dos transplantes é realizada com doadores cadavéricos, que é a situação ideal, pois o rim retirado de um doador vivo poderá fazer falta ao doador. Porém, também é alta a incidência de transplantes realizados com doador vivo-relacionado.

A figura 12 indica a quantidade de transplantes realizados no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, nas décadas de 1980 e 90. Com o passar dos anos, observa-se que a quantidade de transplantes aumentou, devido ao aparecimento de novas metodologias, que possibilitam uma maior garantia de vida ao paciente; maior conscientização da população na doação de órgãos; melhores técnicas utilizadas pelos laboratórios, possibilitando a realização de exames com maior eficácia e que apresentam resultados melhores e mais confiáveis. Além de um maior número de pessoas acometidas por nefropatias diversas a cada ano.



Dos 470 prontuários analisados, 388 apresentavam informações sobre a realização de diálise pelo paciente, e 296 mostravam dados referentes à realização de transfusões (Tabela 5). Do total analisado, cerca de 93,3% das pessoas realizaram algum tipo de diálise e 66,9% receberam transfusões sanguíneas antes do transplante.

Com relação aos exames rotineiramente realizados pelos pacientes, em especial o imunodiagnóstico da toxoplasmose, 307 prontuários apresentavam dados referentes a técnica utilizada e título de anticorpos encontrados. As técnicas mais utilizadas para diagnóstico foram ELISA, IFI e IHA. Como cada um destes métodos utiliza uma unidade para quantificar os títulos de anticorpos encontrados (exemplo: para IFI a positividade ou negatividade do resultado é dada com valores referentes às diluições; a técnica de ELISA apresenta valores em absorbâncias, etc.), e não existe uma unidade que torne equivalente os resultados encontrados, optamos por analisar apenas a positividade ou negatividade dos resultados em IgG e IgM, sem levar em conta os títulos encontrados (Tabela 6).

Tabela 4. Número e percentual de pacientes submetidos a algum tipo de diálise e transfusão

	SIM (%)	NÃO(%)	TOTAL(%)
Diálise	362 (93,3%)	26 (6,7%)	388 (100%)
Transfusão	198 (66,9%)	98 (33,1%)	296 (100%)

Tabela 5. Resultado dos exames para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma* realizados no pré e pós-transplante nos 307 pacientes com sorologia disponível, no período de 1981 a 1999.

PRÉ-TRANSPLANTE		PÓS-TRANSPLANTE		NÚMERO DE PACIENTES
IgM	IgG	IgM	IgG	
+	+	+	+	2
-	+	+	+	5
-	-	+	+	7
-	+	-	+	60
-	-	-	+	8
-	-	-	-	49
-	+	-	-	3
-	+			19
-	-			19
		+	-	2
		+	+	7
		-	+	72
		-	-	54
TOTAL				307

Do total de prontuários analisados, apenas 307 apresentavam sorologia disponível para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma*. Os pacientes que não tiveram acompanhamento sorológico são aqueles que foram a óbito poucos dias após o transplante, e referem-se aos transplantes realizados no início da década de 80, quando não se tinha facilidades no imunodiagnóstico da toxoplasmose e ainda não se sabia da importância desta antrozoose nestes indivíduos. Em 134 prontuários foi possível o acompanhamento sorológico pré e pós-transplante, e em 173 prontuários só estava disponível a sorologia pré ou pós-transplante, pelos motivos citados anteriormente. Nestes indivíduos, torna-se difícil uma análise sobre o curso da doença. Observou-se 13 situações diferentes em relação à sorologia para toxoplasmose. Na primeira delas, dois pacientes apresentaram sempre sorologia positiva. Na

segunda condição, cinco indivíduos eram IgG + pré-transplante e no exame pós-transplante foi detectado IgM também positivo, o que evidencia uma reagudização da toxoplasmose nestes indivíduos, que deve ter acontecido em decorrência da atividade imunossupressora dos medicamentos utilizados por estes pacientes (Figura 13).

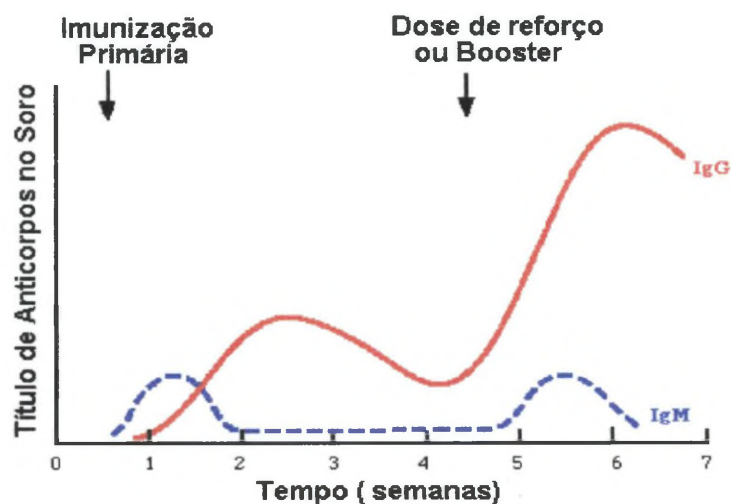


Figura 13. Curvas de representação das respostas imunes primária e secundária com relação as classes de Imunoglobulinas (adaptado de SHELDON).

Em função do tipo de imunoglobulinas presentes no soro, as seguintes interpretações são possíveis:

ANTICORPOS		RESULTADO
IgM -	IgG -	Sem imunidade – suscetível
IgM +	IgG -	Infecção aguda atual
IgM +	IgG +	Infecção recente
IgM -	IgG +	Imunizada

Na terceira situação, observa-se a ocorrência de primoinfecção em sete pacientes, uma vez que estes eram soro-negativos no pré-transplante e soroconverteram no pós-tx. O quarto

caso mostra a existência de 60 pacientes com infecção crônica (positivos para IgG), o que os torna população de risco. Nesta situação estes pacientes necessitam de sorologia rotineira. Na quinta situação, oito pacientes mostraram-se positivos para IgG no pós-tx, evidenciando uma detecção tardia do curso da doença. A realização do exame pode ter perdido a fase aguda da doença, que é caracterizada pela presença de IgM.

O sexto caso apresenta 49 indivíduos com sorologia negativa, e a sétima situação mostra a presença de sorologia positiva para IgG em três pacientes, apenas no pré-transplante. Este resultado pode ter ocorrido por um erro de diagnóstico ou baixa sensibilidade da metodologia utilizada, pois, caso o paciente apresentasse infecção crônica, a sorologia positiva deveria aparecer também no exame realizado no pós-transplante.

Nos casos oito e nove, os 38 prontuários analisados possuíam apenas sorologia pré-tx. Destes, 19 pacientes eram positivos para IgG, caracterizando infecção crônica, e 19 eram soronegativos para toxoplasmose.

Nas quatro últimas situações, somente a sorologia pós-transplante estava disponível, e observa-se 54 pacientes negativos, sete positivos, 72 pacientes que apresentavam curso crônico da doença, e dois pacientes que tinham IgM positivo, confirmando o início da doença. Porém, é importante ressaltar que dos sete pacientes positivos no pós-transplante, dois destes pacientes apresentaram manifestações clínicas, com febre e coriorretinite e abscesso cerebral, o que exigiu tratamento específico.

Estudos realizados na França por RENOULT et al. (1997) com 373 pacientes transplantados renais, indicaram seis pacientes soropositivos para toxoplasmose. Em adição aos casos analisados, foram relatados outros 73 casos de complicações pós-transplante renal, derivadas da soropositividade para esta infecção. Na maioria dos casos, os pacientes foram a óbito, e a infecção resultou da reagudização e transmissão doador/receptor. Os órgãos mais afetados foram o cérebro e o coração.

Todos os 21 pacientes que apresentaram-se nos exames de pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma* positivos para IgG e IgM, eram também positivos para outras infecções, em especial o CMV. Mas constatou-se também a coinfeção com a Doença de Chagas e o Herpes vírus.

O CMV em pacientes imunocomprometidos, como os receptores de transplantes, pode desencadear distúrbios pneumológicas e sistêmicos, como febre e leucopenia, afetando diretamente a evolução normal do enxerto. A metodologia de análise sorológica para CMV

utilizada pelos laboratórios incluiu o método ELISA e MEIA (Micropartículas de Enzimaimunoensaio). Nos 139 pacientes em que foi possível o acompanhamento sorológico pré e pós-tx, 20 eram IgG e IgM positivos no pré e pós-tx: 06 apresentaram as formas invasivas com manifestações clínicas e 14 viremias; 103 pacientes eram IgG positivos no pré-tx: 44 positivaram IgM no pós-tx, sendo 06 formas invasivas e 38 viremias, e 59 mantiveram-se IgM negativo; e 16 pacientes eram soronegativos pré-tx: 10 positivaram IgM e IgG, sendo 04 formas invasivas e 06 viremias. Porém, em 149 pacientes só se encontrava disponível a sorologia pré ou pós-tx. Nesses casos, a positividade de IgG e IgM, impossibilita uma conclusão do curso da doença. Dentre os pacientes que positivaram, as manifestações clínico-laboratoriais mais frequentes foram febre e leucopenia, e o tratamento realizado com Ganciclovir. A prevalência de CMV pós-tx renal é alta, bem como sua manifestação clínica nas formas viremicas e invasivas, o que pode influir na evolução do enxerto e até mesmo por em risco a vida do próprio paciente. A fonte de infecção para pacientes imunodeprimidos pode ter sido o órgão transplantado bem como o sangue, decorrente de possíveis transfusões.

A doença de Chagas ou tripanosomose americana é um problema de Saúde Pública na América Latina. Seu agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*, descrito por Carlos Chagas em 1909. Esta antropozoonose atinge atualmente 16 a 18 milhões de pessoas. Cada ano 500.000 novos casos são registrados e 90 milhões de indivíduos estão expostos ao risco. No homem a doença geralmente apresenta-se de forma crônica, porém é conhecido que em algumas regiões existem pacientes que não apresentam manifestações clínicas. No entanto, outros podem ter manifestações graves. Na fase aguda a sintomatologia pode passar despercebida ou ser oligossintomática (febre, edema bipalpebral, gânglios superficiais). Na fase crônica duas formas clínicas são importantes: a cardiopatia chagásica e megaesôfago e megacólon. Em 271 pacientes foi possível o acompanhamento sorológico pré e pós-transplante e verificou-se que 02 pacientes eram soropositivos e apresentaram manifestações clínicas no pós-transplante e 01 paciente previamente soronegativo, positivou no pós-transplante. Dentre os 68 pacientes em que só estava disponível a sorologia pré ou pós-transplante, observou-se que 04 pacientes apresentaram IgG e IgM positivo no pós-transplante e 01 paciente no pré-transplante. A incidência da doença de Chagas nestes pacientes, não se mostrou alta, porém como estes indivíduos são imunodeprimidos estarão sempre incluídos no grupo de população de risco.

Estudos da coinfeção da toxoplasmose com outras doenças têm sido descritos com indivíduos portadores de malignidades. ISRAELSKI & REMINGTON (1993) relatam que

uma das características mais importante da toxoplasmose em pacientes com câncer é a coinfeção com outros organismos (Tabela 6), principalmente com os vírus. Seu estudo com 104 indivíduos portadores de toxoplasmose e de diferentes neoplasias mostrou que 22 (21%) pacientes apresentaram coinfeções. A virose mais comum é o CMV, que representa aproximadamente 30% das infecções. A freqüente concomitância da ocorrência de CMV e toxoplasmose representa um marco da severidade da imunossupressão destes pacientes. Em camundongos, a infecção aguda de CMV predispõe a reagudização da toxoplasmose, e experimentos *in vitro* sugerem um efeito permissivo do CMV na replicação do *Toxoplasma* (ISRAELSKI & REMINGTON, 1993). Outros patógenos virais significantes em pacientes com câncer incluem, herpes vírus, varicella-zoster e vírus causadores de leucoencefalopatia multifocal progressiva. As coinfeções também ocorrem com fungos e bactérias.

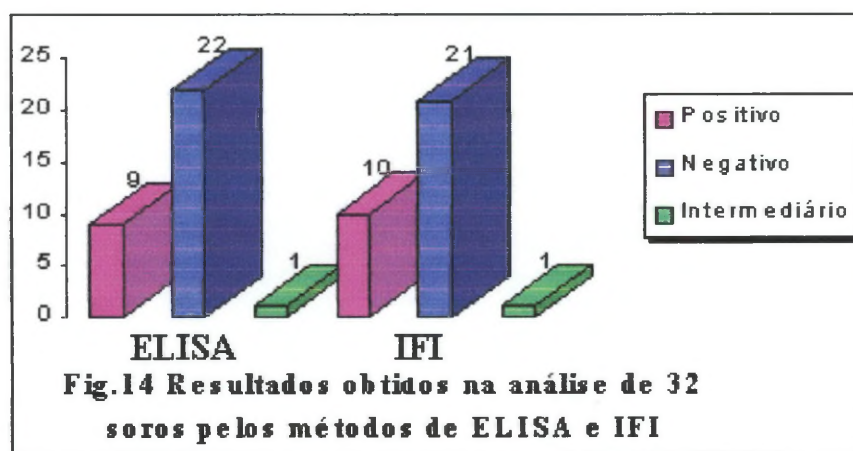
Tabela 6. Freqüência de coinfeções em casos relatados de toxoplasmose em pacientes com câncer (traduzido de ISRAELSKI & REMINGTON, 1993).

NEOPLASIA	NÚMERO DE CASOS RELATADOS DE TOXOPLASMOSE	NÚMERO DE COINFEÇÕES RELATADAS
Linfoma de Hodgkin	59	13
Linfoma de não-Hodgkin	12	3
Leucemia linfocítica aguda	11	5
Leucemia mielocítica aguda	7	0
Leucemia linfocítica crônica	6	0
Leucemia mielocítica crônica	9	1
TOTAL	104	22

5.5. ESTUDO DA INCIDÊNCIA DA TOXOPLASMOSE EM PACIENTES COM NEOPLASIAS

Analisou-se 32 amostras de soros de indivíduos portadores de diferentes neoplasias,

que estavam em tratamento quimioterápico e com drogas imunossupressoras. As amostras eram provenientes de Laboratório Frischmann Aisengart e do Hospital de Clínicas da UFPR, e foram analisadas através dos métodos de IFI e ELISA. Do total analisado pelo método de ELISA, nove amostras apresentaram títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* superiores ao *cut-off*, um soro apresentou valor muito próximo ao *cut-off* estabelecido e foi denominado de soro intermediário e 22 indivíduos eram negativos. Quando analisados pelo método de IFI, 10 amostras apresentaram títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, um soro foi considerado intermediário e 21 indivíduos eram soronegativos (Figura 14). As duas técnicas analisadas não mostraram variações significativas relacionadas no resultado final das amostras, com diferença de apenas um número na copositividade e conegatividade.



Estudos realizados por ISRAELSKI & REMINGTON (1993) no Centro de Câncer Memorial Sloan-Kettering em Nova York, entre 1967 e 1978 identificaram 39 casos de toxoplasmose em pacientes com malignidades. A frequência da ocorrência da toxoplasmose em pacientes portadores de desordens neoplásicas é relatado por HAKES e ARMSTRONG (1983), que evidenciaram que a cada 10.000 pacientes com câncer de mama, dois desenvolvem toxoplasmose e este número aumenta para 366 a cada 10.000 pacientes com leucemia linfocítica crônica. Apesar da pequena quantidade de amostras analisadas e da não disponibilidade das informações relacionadas ao tipo de malignidade que acomete cada paciente analisado, os dados encontrados no nosso trabalho (aproximadamente 28%) estão de acordo com as frequências de ocorrência da toxoplasmose nestes indivíduos. Os dados

referentes ao tipo de malignidade que acomete cada indivíduo analisado não estava disponível porque as Instituições preconizavam a necessidade de preservarem seus pacientes.

5.6. DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma* EM INDIVÍDUOS COM RISCO OCUPACIONAL

Foram analisadas 72 amostras de soros de indivíduos expostos ao risco ocupacional e/ou exposicional (médicos veterinários, alunos de Medicina Veterinária, biólogos e técnicos de Laboratórios) pelos métodos de IFI e ELISA. Do total de soros analisados pelo método de IFI, três amostras apresentaram títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* superiores ao *cut-off* (média x desvio padrão), um soro apresentou valor muito próximo ao *cut-off* estabelecido e foi denominado de soro intermediário e 65 indivíduos eram negativos. Ao serem analisados pela técnica de ELISA, quatro amostras foram soropositivas e 66 amostras soronegativas. (Tabela 7).

Tabela 7. Número de soros analisados, soros que apresentaram titulação positiva compatíveis com doença aguda, soros intermediários e soros não reagentes para ELISA e IFI

TECNICA	SOROS REAGENTES	SOROS INTERMEDIÁRIOS	SOROS NÃO-REAGENTES	NÚMERO TOTAL E PERCENTUAL
IFI	3	1	66	70
	4,3%	1,4%	94,3%	100%
ELISA	4	-	66	70
	5,7%	-	94,3%	100%

A maioria dos estudos que tentaram correlacionar a exposição ocupacional ao *T. gondii* a uma maior soroprevalência em categorias, como médicos veterinários, funcionários de matadouros, técnicos de laboratório e criadores de suínos, não conseguiu demonstrar

diferenças significativas entre esses grupos e a população em geral (PARKER & HOLLIMAN, 1992; SEURI & KOSKELA, 1992; MARTINS & VIANA, 1998). Estes estudos corroboram os dados encontrados em nosso trabalho, que obteve um índice muito baixo (aproximadamente 5%) de anticorpos anti-*T.gondii* na população analisada. Apesar, da população analisada ter sido pequena e da maioria das amostras serem de alunos do 1º e 2º ano de Medicina Veterinária, e que, portanto, ainda não tiveram muito contato com animais e parasitas. Contudo, os dados encontrados confirmam as afirmações de que não existe uma correlação direta entre algumas categorias teoricamente mais expostas ao risco e a toxoplasmose, evidenciando que a população em geral está exposta ao risco. Estudo realizado por NOGUEIRA et al. (1996), relata que 70% da população no Brasil apresenta anticorpos anti-*T. gondii*, bem como o trabalho de COUTINHO et al. (1981), que encontrou uma prevalência de 78,7% num estudo com 6079 indivíduos do Rio de Janeiro, em um período de sete anos. UCHÔA et al. (1999) analisando 103 soros também de indivíduos do Rio de Janeiro, encontrou uma prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* de 78,6%. Os dados indicam que a soroprevalência da toxoplasmose no Brasil é alta.

6. CONCLUSÕES

A técnica de ELISA mostrou-se satisfatória para o imunodiagnóstico da toxoplasmose humana. A prova de ELISA, utilizando-se a concentração de 150ng de antígeno por *well*, a diluição dos soros em 100 vezes bem como a diluição do conjugado em 10000 vezes, e *cut-off* estabelecido de 0,064 D.O., chegou a resultados que nos permitem estabelecer o diagnóstico da toxoplasmose.

A técnica de Imunofluorescência Indireta apresenta como vantagens a fácil execução, utilização de reativos comercializados de boa conservação e leitura qualitativa capaz de diferenciar anticorpos específicos. Contudo, a leitura muitas vezes é difícil e a determinação do título é delicada para determinados soros.

A análise estatística da comparação entre as duas técnicas mostrou um índice de sensibilidade de 80% e de especificidade de 98,9% e evidenciou que a padronização da técnica de ELISA com os valores citados acima é eficiente e emite resultados confiáveis.

O levantamento de prontuários dos pacientes imunocomprometidos por terapia pós-transplante renal, evidenciou que grande parte dos indivíduos transplantados fez diálise e recebeu transfusões sanguíneas, o que neste caso, aumenta o risco de contaminação pelo *Toxoplasma*, já que este pode ser transmitido por hemotransfusões.

Apesar da sintomatologia da infecção por *T. gondii* ser relativamente incomum em indivíduos imunocompetentes, ela é uma infecção significante em transplantados renais. O estudo da incidência da toxoplasmose nos indivíduos imunodeprimidos por terapia pós-transplante renal evidenciou que 7,3% dos pacientes analisados eram positivos para a toxoplasmose e destes, 4,17% representavam primoinfecção, 2,08% reagudização e 55,21% indivíduos estavam em fase crônica da doença. Mesmo essa população apresentando elevada prevalência de títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma*, o que os torna população de risco, a sobrevida dos pacientes analisados foi de 99,7%. Isso porque estes pacientes são acompanhados frequentemente e em caso de manifestação clínica, estes indivíduos são submetidos a tratamento específico. No caso de primoinfecção pós-transplante é importante ressaltar que o próprio órgão transplantado e o sangue, de possíveis transfusões, podem atuar como fonte transmissora da toxoplasmose.

A positividade (28%) para anticorpos IgG anti-*Toxoplasma* nos indivíduos portadores de diferentes malignidades foi alta.

Nas duas populações de risco analisadas (transplantados e neoplásicos) o índice de indivíduos que tiveram contato primário com o parasito é elevado, uma vez que estes indivíduos estão em constante estado de imunodepressão. Porém, este índice é relativamente parecido com as taxas encontradas na população imunologicamente normal, evidenciando que a soroprevalência da toxoplasmose é alta nas duas populações, e que toda e qualquer população está exposta ao risco. Mas, a toxoplasmose é mais preocupante em indivíduos imunocomprometidos pois estes indivíduos não conseguem evitar a disseminação da doença.

O estudo com os indivíduos expostos ao risco ocupacional e/ou exposicional apresentou um baixo índice de positividade para *T. gondii*, evidenciando que não existe diferença na soroprevalência da toxoplasmose nas diferentes categorias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*. Editora Revinter, 3ª edição, 1999.
- AMATO NETO, V. *Toxoplasmose*. Editora Savier, São Paulo, 1982.
- ARNOLD, S.J.; KINNEY, M.C.; McCORMICK, M.S.; DUMMER, S.; SCOTT, M.A. Disseminated toxoplasmosis: Unusual presentations in the immunocompromised host. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **121**(8):869-873, 1997.
- BRETAGNE, S.; COSTA, J.M.; KUENTZ, M.; SIMON, D.; VIDAUD, M.; FORTEL, I.; VERNANT, J.P.; CORDONNIER, C. Late toxoplasmosis evidenced by PCR in a marrow transplant recipient. *Bone Marrow Transplantation*, **15**(5):809-811, 1995.
- CALAMEL, M. & DUFOUR, P. Sérodiagnostic de la toxoplasmose: comparaison des titres d'unités internationales obtenus par l'IFI em dilution finale et par ELISA en dilution unique selon un modèle informatisé. *Revue de Medecine Veterinaire*, **136**(8/9):645-651, 1985.
- CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W.; ROCCA, A.; BELEM, Z.R. Um teste prático para a sorologia da toxoplasmose: o teste de hemaglutinação. Estudo comparativo com os testes de Imunofluorescência e enzimático de captura de IgM. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, **22**:196-201, 1986.
- CAZANAVE, J.; FORESTIER, F.; BESSIERES, M.H.; BROUSSIN, B.; BEGUERET, J. Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenatal Diagnostic*, **12**:119-127, 1992.
- CHOI, M.Y.; NAM, H.W.; YOUN, J.H.; KIM, D.J.; KONG, Y.; KANG, S.Y.; CHO, S.Y. Detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid to *Toxoplasma gondii* by

- indirect latex agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Kisaengchunghak-Chapchi*, **30**(2): 83-90, 1992.
- CONTRERAS, M.D.C.; SCHENONE, H.; SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; ROJAS, A. Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **38**(6):431-435, 1996.
- COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; CAMILLO-COURA, L.; MARZOCHI, M.C.A.; AMENDOEIRA, M.R.R. Levantamento dos resultados das reações de Imunofluorescência Indireta para toxoplasmose em 6079 pacientes de ambulatório ou gestantes no Rio de Janeiro realizadas durante o exame de 1970-1977. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **23**:48-56, 1981.
- DEROUIN, F. & THULLIEZ, P. Diagnostic Biologique de la toxoplasmose. *Supplément au Laborama*, **33**, 1993.
- DEROUIN, F. & GARIN, Y.J.F. Isolement de *T. gondii* par culture cellulaire chez les sujets infecté par le VIH. *Presse Medicale*, **21**, 1992.
- DESMONTS, G. & REMINGTON, J.S. Direct agglutination for diagnosis of *Toxoplasma* infection: meted for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, **11**:562-568, 1980.
- DESMONTS, G.; COUVREUR, J.; THULLIEZ, P.; SAINT-JOIGNY, C. Sérodiagnostic de la toxoplasmose acquise. Des méthodes simples pour des questions précises. *Concours Médecine*, **107** (3):227-234, 1985.
- DUBEY, J.P. & BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton. *CRC Academic Press*, 1-220, 1988.

- ENGSTROM, R.E.; HOLLAND, G.N.; NUSSENBLATT, R.B.; JABS, D.A. Current practice in the management of ocular toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology*, **111**:601-611, 1991.
- ENGVALL, E. & PERLAMANN, P. Enzyme Linbeal Immunosorbent Assay ELISA. *Journal of Immunology*, **109**:129-135, 1972.
- EY, P.L. et al. Isolation of pure IgG₁, IgG₂ and IgG_{2b} Immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry*, **15**:429-436, 1978.
- FINAU, J. et al. Congresso Científico 10 Años del CYTED - Program Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo, 6-10 Outubro, Cancún, México, 1994.
- FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; TUDURY, E.A.; VIANNA, C.C. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães atendidos no Hospital Veterinário da UEL-PR. *Semina*, **13**(1):66-69, 1992.
- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N. *Toxoplasma gondii* in cats fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, **167**:893-896, 1970.
- FRENKEL, J.K. *Toxoplasma* in and around us. *Bio Science*, **23**(6):343-352, 1973.
- FRENKEL, J.K. Toxoplasmose. In Veronesi. Doenças Infecciosas e Parasitárias, 8ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 734-749, 1991.
- GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C.; GARCIA, S.M.; LEITE, J. Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela Tela de Amsler, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **32**(6):671-676, 1999.
- GARRIDO, J.A. *Toxoplasmosis*. Madrid: Ed. Morban, 1978.

- GERMANO, P.M.L.; ERBOLATO, E.B.; ISHIZUKA, M.M. Estudo sorológico da toxoplasmose canina, pela prova de Imunofluorescência Indireta, na cidade de Campinas, 1981. *Revista Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia*. USP, São Paulo, **22**:53-58, 1985.
- GIOVANNONI, M. Considerações gerais sobre *Toxoplasma* e a toxoplasmose. Isolamento do agente etiológico e pesquisa de anticorpos em cães. Escola Superior de Agricultura e Veterinária do Paraná, 1968. (Tese de Mestrado).
- GROVER, C. M.; REMINGTON, J.S.; BOOTHROYD, J.C. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**:2297 – 2301, 1990.
- HAKES, T.B.; ARMSTRONG, D. Toxoplasmosis: problems in diagnosis and treatment. *Cancer*, **52**:1535-1540, 1983.
- HOHLFELD, P.; DAFFOS, F.; COSTA, J.M.; THULLIEZ, P.; FORESTIER, F.; VIDAUD, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain reaction test on amniotic fluid. *New England Journal of Medicine*, **331**: 695-699, 1994.
- HOLLIMAN, R.E.; JOHNSON, J.; DUFFY, K. Discrepant *Toxoplasma* latex agglutination test results. *Journal of Clinical Pathology*, **42**:200-203, 1989.
- ISHIZUKA, M.M. & YASUDA, P.N. Incidência de infecção por *Toxoplasma gondii* em cães no município de São Paulo. *Revista Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia* USP, São Paulo, **18**:161-165, 1981.
- ISRAELSKI, D.M. & REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in patients with cancer. *Clinical Infectious Diseases*, **17**(2):423-435, 1993.
- KUBY, J. *Immunology*. 4ª edição, New York: W.H. Freeman and Company, 1995.

- LOWENBERG, B.; VAN GIJN, J.; PRINS, E.; POLDERMAN, A.M. Fatal cerebral toxoplasmosis in a bone marrow transplant recipient with leukemia. *Transplantation* (Baltimore), **35**(1):30-34, 1983.
- MARTINS, C. S. & VIANA, J.A. Toxoplasmose - o que todo profissional de saúde deve saber. *Clinica Veterinária*, **15**:33-37, 1998.
- MAYES, J.T.; O'CONNOR, B.J.; AVERY, R.; CASTELLANI, W.; CAREY, W. Transmission of *Toxoplasma gondii* infection by liver transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, **21**(3):511-515, 1995.
- MINOZZO, J.C. Padronização da Técnica de ELISA para diagnóstico da cisticercose Bovina. Curso de mestrado em Ciências Veterinárias, 1997.
- MORLAT, P. & LEPOR, C. La prophylaxie de la toxoplasmose chez les patients immunodéprimés. *Annales de Medecine Interne*, **148**(3): 235-239, 1997.
- NAKANE, P.K. Peroxidase Labeled Antibody. A New Method of Conjugation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **22**(12):1084-91, 1974.
- NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. São Paulo, Atheneu, 9ª ed., 174-186, 1995.
- NEUMANN, J.; FILHO, M.A.; GARCIA, V.D. *Transplante de órgãos e tecidos*. São Paulo: Editora Sarvier, 1997.
- NICOLE, C. & MANCEAUX, L. H. Sur un protozoaire nouveau du gondii. *Compte Rendu Academic Science*, **149**:369-372, 1909.
- NICOLE, C. & MANCEAUX, L. H. Sur une infection a coyés de Leishman (on organisms voisins) du gondi. *Compte Rendu Hebdomad Leance Acaemic Science*, **147**:763-766, 1908 in AMATO NETO, V. *Toxoplasmose*. São Paulo: Sarvier, 1982.

- NOGUEIRA, A.S.; MOREIRA, R.B.; PEREIRA, N.G. Toxoplasmose – diagnóstico e tratamento. *Jornal Brasileiro de Medicina*, 71:38-44, 1996.
- ODY, P. The Herby Society's Complete Medicinal Herbal. *Dorling Kindersley*, 1993.
- PARKER, S.L. & HOLLIMAN, R.E. Toxoplasmosis and laboratory workers: a case-control assesment of risk. *Medical Laboratory Science*, 49(2): 103-106, 1992.
- PÊSSOA, S.B. *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988.
- PRATLONG, F.; BOULOT, P.; VILLENA, I.; ISSERT, E.; TAMBY, I.; CAZENAVE, J.; DEDET, J.P. Antenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of the biological parameters in a cohort of 286 patients. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 103:552-557, 1996.
- RENOULT, E.; GEORGES E.; BIAVA, M.F.; HULIN, C.; FRIMAT, L.; HESTIN, D.; KESSLER, M. Toxoplasmosis in kidney transplant recipients: Report of six cases and review. *Clinical Infectious Diseases*, 24(4):625-634, 1997.
- ROBERTS, T.; MURRELL, K.D.; MARKS, S. Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. *Parasitology Today*, 10:419-423, 1994.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Immunology*, 5ª edição, London: Mosby, 1998.
- RÖSE, I. Morphology and Diagnostics of human toxoplasmosis. *General & Diagnostic Pathology*, 142:257-270, 1997.
- SAVVA, D.; MORRIS, J.C.; JOHNSON, J.D.; HOLLIMAN, R.E. Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Medical Microbiology*, 32:25-31, 1990.

- SEURI, M. & KOSKELA, P. Contact with pigs and cats associated with high prevalence of *Toxoplasma* antibodies among farmers. *British Journal of Industrial Medicine*, **49**(12):845-849, 1992.
- SHELDON, P. Humoral Immunity[Online]. In: [www. micro.mab.le.ac.uk/MBChB/3b.html](http://www.micro.mab.le.ac.uk/MBChB/3b.html)
Captado 20 março 2000.
- SILVA, D.A.O.; CABRAL, D.D.; BERNARDINA, B.L.; SOUZA, M.A; MINEO, J.R.
Detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in dogs. A comparative study of
Immunoenzymatic, Immunofluorescent and Haemagglutination titers. *Memórias do
Instituto Oswaldo Cruz*, **92**(6):785-789, 1997.
- SMITH, J.L. Long-Term consequences of foodborne toxoplasmosis: effects on the unborn,
the immunocompromised, the elderly, and the immunocompetent. *Journal of Food
Protection*, **60**(12):1595-1611, 1997.
- SOULIER, L.M.; ZULIAN, G.; PIZZOLATO, G.; COX, J.; HELG, C.; BERIS, P.
Disseminated toxoplasmosis in a severely immunodeficient patient: Demonstration of
cysts in bone marrow smears. *American Journal of Hematology*, **38**(4):324-326, 1991.
- SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli incontrato nelle lesioni anatomiche
d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar del l'uomo. *Rev. Soc. Science* (São
Paulo) **3**:109-112, 1908, in AMATO NETO, V. *Toxoplasmosse*. São Paulo: Sarvier, 1982.
- TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*. Editora Roca, 5ª edição, 1998.
- UCHÔA, C.M.A.; DUARTE, R.; SILVA, V.L.; ALEXANDRE, G.M.C.; FERREIRA, H.G.;
AMENDOEIRA, M.R. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de
anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de
imunofluorescência indireta. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*,
32(6): 661-669, 1999.

VAN KNAPEN, F.V. Immunodiagnosis of toxoplasmosis. *Drukkerij Veenman BV*, Wagenigen, 1984.

VIDOTTO O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na Saúde Animal. *Semina*, **13**(1):69-75, 1992.

WILSON, M.; WARE, D.A.; JURANEK, D.D. Serologic aspects of toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **196**(2):277-280, 1990.

ANEXOS

ANEXO 1. SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA A DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY (1951)

REATIVOS

A) carbonato de sódio anidro - 20g

 hidróxido de sódio - 4g

 H₂O q.s.p. - 1000ml

B) sulfato de cobre - 2g

 H₂O destilada q.s.p. - 100ml

C) tartarato de sódio - 4g

 H₂O destilada q.s.p. - 100ml

No momento de usar: misturar 1ml do reativo B + 1 ml do reativo C, e adicionar 100ml do reativo A.

D) Reativo de Folin-Ciocalteu na diluição de 1:3.

E) Solução padrão de albumina bovina: adicionar 20mg de albumina em um balão volumétrico de 100ml, adicionar 01 à 02 gotas de hidróxido de sódio diluído e completar o volume com água. Esta solução contém 100µg de albumina por 0,5ml.

ANEXO 2. SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA O TESTE DE ELISA

* LISTA DE REATIVOS

- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Caseína
- Carbonato de sódio (Na_2CO_3)
- Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$)
- Fosfato de sódio Dibásico (Na_2HPO_4)
- Cloreto de sódio ($NaCl$)
- Hidróxido de sódio ($NaOH$)
- Ortofenilenodiamino (OPD)
- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
- Sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- Tween 20

* COATING BUFFER (tampão carbonato 0,005 M)

- Solução A: 1,1g de Na_2CO_3 para 200ml de H_2O deionizada
 - Solução B: 4,2g de $NaHCO_3$ para 1 litro de H_2O deionizada
- Acertar o pH para 9,6 adicionando a solução A em B

* SOLUÇÃO DE LAVAGEM

- 9g de $NaCl$
 - 0,5ml de Tween 20
 - H_2O (d) q.s.p. 1 litro
- Adicionar Tween 20 após dissolver o $NaCl$

* SOLUÇÃO DE BLOQUEIO DA PLACA

- Caseína 2% em PBS - aquecer para facilitar a dissolução

Constituição do PBS 0,05 M com 0,15 M de $NaCl$ pH 7,4:

Solução A

- 7,1 g Na_2HPO_4 ou 10,82g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 8,8 g NaCl
- H_2O (d) q.s.p. 1 litro

Solução B

- 1,4 g NaH_2PO_4
- 1,88 g NaCl
- H_2O (d) q.s.p. 0,2 litros

Acertar o pH para 7,4 adicionando a solução B em A

*** TAMPÃO DE INCUBAÇÃO**Preparação A

- 0,25% de caseína
- 0,05% de Tween 20
- Diluição em PBS

Preparação B

- Tampão de incubação a partir da solução de bloqueio
 - 62,5ml de solução de bloqueio
 - 0,25ml de Tween 20
 - PBS q.s.p. 500ml
- Alicotar em volumes de 10ml e congelar

*** TAMPÃO CITRATO - pH 5,0**

- 7,10 g Na_2HPO_4 ou 13,4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 5,19 g de ácido cítrico
- H_2O (d) q.s.p. 1 litro

*** SOLUÇÃO SUBSTRATO - OPD 2mg**

- Orto-fenileno-diamino (OPD) -2mg

- 2 μ l H₂O₂
- 10ml de Tampão citrato pH 5,0

A solução substrato deve ser preparada no momento da utilização. Para isso, deve-se pipetar o tampão citrato, adicionar o OPD e H₂O₂. O recipiente deve ser deixado ao abrigo da luz até a dissolução do OPD. A seguir, procede-se a distribuição na placa.

*** SOLUÇÃO DE BLOQUEIO DA REAÇÃO**

- 1ml de H₂SO₄
- 19ml de H₂O (d)

ANEXO 3. SOLUÇÕES UTILIZADAS NO TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

REATIVOS

- Antígeno: suspensão liofilizada de *Toxoplasma gondii* obtida de líquido intraperitoneal de ratos.
- Conjugado: anti IgG canina marcada com fluoresceína
- Tampão fosfato PBS 7,2
- Solução de Azul de Evans a 1/1000

ANEXO 4. RESULTADOS OBTIDOS NAS TÉCNICAS DE IFI E ELISA PARA AS 102 AMOSTRAS ANALISADAS

SOROS DE INDIVÍDUOS NEOPLÁSICOS	TÍTULO DE ANTICORPOS ANTI- <i>Toxoplasma</i> (IFI)	VALOR DE ABSORBÂNCIA ÓPTICA (ELISA)
1	(+/-) 1:32 (N)	0,039nm (N)
2	(+) 1:32 (N)	0,044nm (N)
3	(+/-) 1:32 (N)	0,007nm (N)
4	(+/-) 1:128 (P)	0,042nm (N)
5	(+) 1:128 (P)	0,142nm (P)
6	(-) 1:32 (N)	0,057nm (N)
7	(+/-) 1:32 (N)	0,004nm (N)
8	(-) 1:32 (N)	0,008nm (N)
9	(-) 1:32 (N)	0,027nm (N)
10	(-) 1:32 (N)	0,034nm (N)
11	(+/-) 1:128 (P)	0,166nm (P)
12	(+) 1:128 (P)	0,104nm (P)
13	(+) 1:64 (P)	0,084nm (P)
14	(+/-) 1:32 (N)	0,028nm (N)
15	(+/-) 1:64 (P)	0,168nm (P)
16	(+) 1:64 (P)	0,523nm (P)
17	(+/-) 1:64 (P)	0,589nm (P)
18	(-) 1:32 (N)	0,023nm (N)
19	(-) 1:32 (N)	0,019nm (N)
20	(-) 1:32 (N)	0,014nm (N)
21	(-) 1:32 (N)	0,009nm (N)
22	(-) 1:32 (N)	0,021nm (N)
23	(+/-) 1:32 (N)	0,019nm (N)
24	(+/-) 1:64 (P)	0,103nm (P)
25	(-) 1:32 (N)	0,025nm (N)
26	(+) 1:64 (P)	0,075nm (P)
27	(-) 1:32 (N)	0,021nm (N)
28	(+/-) 1:32 (N)	0,010nm (N)
29	(+) 1:64 (P)	0,040nm (N)
30	(-) 1:32 (N)	0,009nm (N)
31	(+/-) 1:32 (N)	0,033nm (N)
32	(-) 1:32 (N)	0,030nm (N)

P= Positivo; N = Negativo; PN = Positivo/Negativo (soros intermediários)

SOROS DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO RISCO OCUPACIONAL	TÍTULO DE ANTICORPOS ANTI- <i>Toxoplasma</i> (IFI)	VALOR DE ABSORBÂNCIA ÓPTICA (ELISA)
1	(-) 1:32 (N)	0,011nm (N)
2	(-) 1:32 (N)	0,014nm (N)
3	(-) 1:32 (N)	0,032nm (N)
4	(-) 1:32 (N)	0,017nm (N)
5	(-) 1:32 (N)	0,018nm (N)
6	(-) 1:32 (N)	0,017nm (N)
7	(-) 1:32 (N)	0,010nm (N)
8	(-) 1:32 (N)	0,027nm (N)
9	(-) 1:32 (N)	0,058nm (N)
10	(-) 1:32 (N)	0,028nm (N)
11	(-) 1:32 (N)	0,019nm (N)
12	(-) 1:32 (N)	0,030nm (N)
13	(-) 1:32 (N)	0,042nm (N)
14	(-) 1:32 (N)	0,011nm (N)
15	(+/-) 1:64 (P)	0,080nm (P)
16	(-) 1:32 (N)	0,018nm (N)
17	(-) 1:32 (N)	0,015nm (N)
18	(-) 1:32 (N)	0,037nm (N)
19	(+) 1:32 (N)	0,009nm (N)
20	(-) 1:32 (N)	0,009nm (N)
21	(-) 1:32 (N)	0,012nm (N)
22	(-) 1:32 (N)	0,009nm (N)
23	(-) 1:32 (N)	0,030nm (N)
24	(+/-) 1:32 (N)	0,062nm (PN)
25	(-) 1:32 (N)	0,033nm (N)
26	(-) 1:32 (N)	0,020nm (N)
27	(-) 1:32 (N)	0,034nm (N)
28	(-) 1:32 (N)	0,010nm (N)
29	(-) 1:32 (N)	0,021nm (N)
30	(-) 1:32 (N)	0,023nm (N)
31	(+/-) 1:32 (N)	0,034nm (N)
32	(-) 1:32 (N)	0,020nm (N)
33	(-) 1:32 (N)	0,020nm (N)
34	(-) 1:32 (N)	0,022nm (N)
35	(-) 1:32 (N)	0,028nm (N)
36	(-) 1:32 (N)	0,020nm (N)
37	(-) 1:32 (N)	0,018nm (N)
38	(-) 1:32 (N)	0,012nm (N)
39	(-) 1:32 (N)	0,026nm (N)
40	(-) 1:32 (N)	0,025nm (N)
41	(-) 1:32 (N)	0,010nm (N)
42	(-) 1:32 (N)	0,012nm (N)

43	(-) 1:32 (N)	0,033nm (N)
44	(-) 1:32 (N)	0,029nm (N)
45	(+/-) 1:64 (P)	0,019nm (N)
46	(-) 1:32 (N)	0,034nm (N)
47	(-) 1:32 (N)	0,020nm (N)
48	(+) 1:128 (P)	0,265nm (P)
49	(-) 1:32 (N)	0,018nm (N)
50	(-) 1:32 (N)	0,016nm (N)
51	(-) 1:32 (N)	0,021nm (N)
52	(-) 1:32 (N)	0,021nm (N)
53	(+/-) 1:128 (P)	0,101nm (P)
54	(-) 1:32 (N)	0,017nm (N)
55	(-) 1:32 (N)	0,026nm (N)
56	(-) 1:32 (N)	0,014nm (N)
57	(-) 1:32 (N)	0,024nm (N)
58	(-) 1:32 (N)	0,001nm (N)
59	(-) 1:32 (N)	0,003nm (N)
60	(-) 1:32 (N)	0,010nm (N)
61	(-) 1:32 (N)	0,009nm (N)
62	(-) 1:32 (N)	0,034nm (N)
63	(-) 1:32 (N)	0,009nm (N)
64	(-) 1:32 (N)	0,030nm (N)
65	(-) 1:32 (N)	0,125nm (P)
66	(-) 1:32 (N)	0,004nm (N)
67	(-) 1:32 (N)	0,010nm (N)
68	(-) 1:32 (N)	0,007nm (N)
69	(-) 1:32 (N)	0,007nm (N)
70	(-) 1:32 (N)	0,011nm (N)

P= Positivo; N = Negativo; PN = Positivo/Negativo (soros intermediários)