

SIMONE CRISTINA MASSUQUETTO

TOXOPLASMOSE EM GESTANTES

CURITIBA

2002

SIMONE CRISTINA MASSUQUETTO

TOXOPLASMOSE EM GESTANTES

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

Orientadora: Ida Cristina Gubert

Co-orientadora: Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2002

AGRADECIMENTOS

À Professora Ida Cristina Gubert, pela oportunidade e orientação.

À Professora Doutora Vanete Thomaz Soccol, por me acolher em seu laboratório, pela orientação e pelos "puxões de orelha".

À toda a equipe do Laboratório de Parasitologia Molecular, Edilene Alcântara, Rosângela Paulino, João Carlos Minozzo, Rogério Luiz Kopp, Andréa Soccol, Fernanda Rosalinski, Juliana Traks, Luciane Mara Henning, André Luiz de Almeida Mello, Vanessa Piccolo e em especial à Daniela Pedrassani, pela amizade e ajuda.

À equipe de médicos e enfermeiras da Maternidade Nossa Senhora de Fátima de Curitiba, Luiz Carlos Carzino, Audrey Moura, Irmã Eufrida Meurer, Lindamir Alves Danguí, pela colaboração.

À Juliane Franzen Stancik, pela amizade verdadeira e por toda a ajuda no decorrer desta monografia e de todo o período de faculdade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
RESUMO	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	10
3. MÉTODO	11
3.1. POPULAÇÃO A SER ESTUDADA E OBTENÇÃO DE SOROS.....	11
3.1.1. POPULAÇÃO DE MULHERES GESTANTES.....	11
3.1.2. OBTENÇÃO DE SOROS.....	11
3.2. CEPA RH PADRÃO DE <i>Toxoplasma gondii</i> PARA PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS.....	11
3.3. TÉCNICAS SOROLÓGICAS.....	12
3.3.1. TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – IFI.....	12
3.3.1.1. Soluções.....	13
3.3.1.2. Antígeno.....	13
3.3.1.3. Soros.....	14
3.3.1.4. Conjugado.....	14
3.3.1.5. Procedimento.....	14
3.3.2. TÉCNICA DE ENZIMAIMUNOENSAIO – ELISA.....	15
3.3.2.1. Soluções.....	16
3.3.2.2. Antígeno.....	18
3.3.2.3. Dosagem de proteínas pelo método Lowry et al. (1951).....	19
3.3.2.4. Soros.....	19
3.3.2.5. Conjugado.....	19
3.3.2.6. Procedimento.....	20
3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELISA INDIRETA PARA O DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE EM GESTANTES.....	22

4.1.1. ANTÍGENO.....	22
4.1.2. SOROS.....	22
4.1.3. CONJUGADO.....	22
4.1.4. <i>CUT-OFF</i>	23
4.2. ESTUDO COMPARADO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AS TÉCNICAS DE IFI E ELISA.....	23
4.2.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – IFI.....	23
4.2.2. ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO – ELISA INDIRETO.....	24
4.2.3. COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS.....	25
4.3. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS TÉCNICAS.....	26
4.4. PREVALÊNCIA DE TÍTULO DE ANTICORPOS IgG ANTI- <i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i> EM GESTANTES.....	26
4.5. DISCUSSÃO.....	29
5. CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXO 1.....	36
ANEXO 2.....	38
ANEXO 3.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Ciclo evolutivo do <i>Toxoplasma gondii</i>	02
FIGURA 2: Taquizoítos.....	03
FIGURA 3: Cisto tecidual contendo bradizoítos.....	03
FIGURA 4: Oocisto imaturo.....	04
FIGURA 5: Oocisto esporulado.....	04
FIGURA 6: Mecanismos de contaminação dos hospedeiros definitivos e intermediários.....	05
FIGURA 7: Cultivo da cepa RH padrão de <i>T. gondii</i>	12
FIGURA 8: IFI Não reagente.....	13
FIGURA 9: IFI Reagente.....	13
FIGURA 10: Placa de ELISA.....	16

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número de amostras que apresentam título de anticorpos.....	24
TABELA 2 – Comparação entre as técnicas de IFI e ELISA INDIRETO.....	25
TABELA 3 – Resultados da técnica de imunofluorescência indireta em relação ao valor de referência (diluição 1:64).....	27
TABELA 4 – Titulação das amostras positivas da técnica de imunofluorescência indireta.....	27
TABELA 5 – Resultados da técnica de enzimaímunoensaio indireto em relação ao valor de <i>cut-off</i> (D.O. = 0,120).....	28

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Soroprevalência de título de anticorpos IgG anti - <i>T. gondii</i> em gestantes, pelas técnicas de Imunofluorescência indireta (IFI) e Enzimaimunoensaio indireto (ELISA INDIRETO)(%).....	25
GRÁFICO 2 – Resultado gráfico da técnica de Imunofluorescência indireta, em relação ao valor de referência (%).....	27
GRÁFICO 3 – Resultado gráfico da titulação das amostras positivas na técnica de Imunofluorescência indireta (%).....	28
GRÁFICO 4 – Resultado gráfico da técnica de Enzimaimunoensaio indireto, em relação ao valor de <i>cut-off</i> (0,120) (%).....	29

RESUMO

Toxoplasmose é uma das mais comuns zoonoses parasitárias do mundo. Durante os últimos anos passou a ser concedida maior importância médica, porque os estudos sobre esta afecção demonstram que a patologia é realmente um problema comum e não uma simples doença excepcionalmente diagnosticada. Formas graves da toxoplasmose, com sintomas mais severos, podem ser observadas em duas situações: infecção intra-uterina (congenita) e em primoinfecção ou reagudização em indivíduos imunocomprometidos. A toxoplasmose congênita (TC) ocorre quando a mulher adquire o protozoário, pela primeira vez, durante a gestação e o transmite para o feto. Em humanos, o problema social decorrente deste tipo de infecção é bastante sério. As manifestações clínicas da TC variam da clássica tríade de Sabin (microcefalia, calcificação intracraniana, coriorretinite e retardo mental) até a ocorrência de aborto. Nas gestações subsequentes a mãe já adquiriu anticorpos e a gravidez ocorre normalmente. Na maioria dos casos, a sorologia representa a base do diagnóstico e do controle da toxoplasmose. Visando conhecer a prevalência de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em gestantes, foi estudada uma população de 152 gestantes, em diferentes estágios gestacionais, atendidas na Maternidade N. Sra de Fátima de Curitiba. Para o estudo foi padronizada a técnica de ELISA indireta que ficou estabelecida em 300ng de antígeno por poço, soros e conjugado diluídos 100 e 5000 vezes, respectivamente. A técnica de IFI foi usada como padrão ouro na comparação e avaliação dos resultados. Foram analisadas 152 amostras de soros de gestantes. O ELISA padronizado apresentou copositividade de 94,6% e conegatividade de 82,5% em comparação com a IFI. Na técnica de IFI 43,4% das amostras foram reagentes (*cut-off* - 1:32) enquanto na técnica de ELISA indireta 45,4% reagiram (*cut-off* - 0,12nm). Os resultados demonstraram que o percentual de gestantes com título negativo, ou seja, mulheres sujeitas à primoinfecção durante a gestação, é alto (55,6%). Estas gestantes devem receber acompanhamento sorológico durante toda a gestação, com a finalidade de diagnóstico precoce e tratamento breve no caso de soroconversão.

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma antroponose causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário de distribuição cosmopolita, parasita intracelular obrigatório pertencente à classe dos esporozoários (Protozoa; Apicomplexa; Sporozoa).

Este protozoário foi descrito por Splendore, no Brasil em 1908, que o isolou em coelhos e simultaneamente por Nicolle & Manceaux, na África, no mesmo ano, que o isolaram no roedor *Ctenodactylus gundi*, e lhe atribuíram o nome de *Leishmania gondii*. Depois, sendo constatado pelos mesmos pesquisadores que não se tratava de *Leishmania* passou a ser denominado *Toxoplasma gondii* (NEVES, 1995).

É um parasito de pouca especificidade quanto aos hospedeiros intermediários, que podem ser vários vertebrados, principalmente aves e mamíferos. Porém os únicos hospedeiros definitivos são os membros da família Felidae (domésticos e selvagens), visto que são os únicos a liberarem oocistos através das fezes, favorecendo a contaminação de pessoas e outros animais (FRENKEL, 1958). Por essa grande variedade de possíveis hospedeiros o *T. gondii* é considerado um dos parasitas mais polixenos (ARAÚJO *et al.* 1998).

O ciclo evolutivo (FIGURA 1) comporta uma reprodução sexuada, por gametogonia, ou enteroepitelia, que ocorre no epitélio intestinal dos felídeos não imunes. E outra assexuada ou extra-intestinal, por endidiogenia, que ocorre nos tecidos de outros vertebrados (hospedeiros intermediários).

O *T. gondii* apresenta três formas infectantes:

- Os **taquizoítos** (FIGURA 2), parasitos do sistema fagocítico mononuclear, caracterizados por uma rápida multiplicação intracelular, o que leva à lise das células parasitadas.
- Os **cistos teciduais** (FIGURA 3), constituídos por uma membrana espessa e resistente contendo centenas a milhares de **bradizoítos**, que são as formas de reprodução lenta, que não causam lise celular.
- Os **oocistos** (FIGURA 4), que só ocorrem no hospedeiro definitivo, e representam a forma final da fase sexual intestinal.

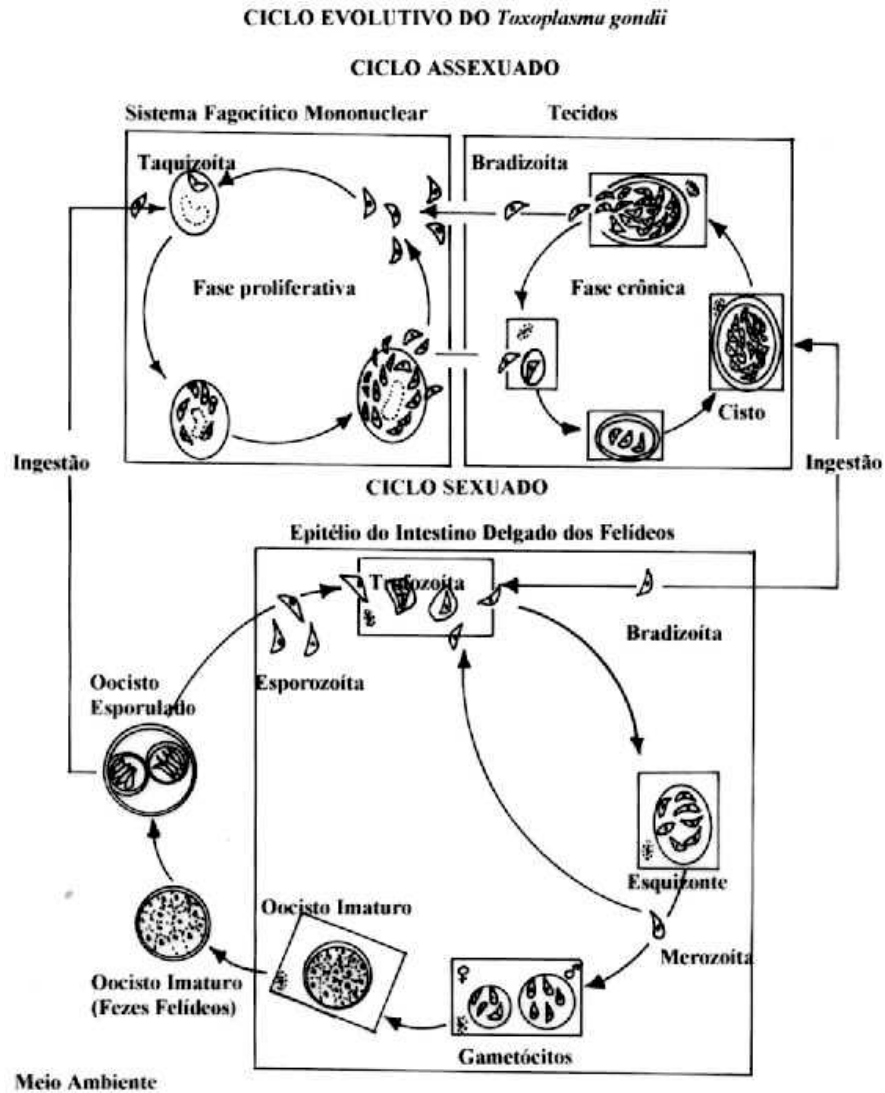


FIGURA 1: Ciclo evolutivo do *Toxoplasma gondii*

Adaptado de: Pessoa, 1982.

No ciclo assexuado o hospedeiro ingere cistos ou oocistos, que terão suas paredes rompidas por ação enzimática e as formas infectantes são liberadas no lúmen intestinal (bradizoítos e esporozoítos, respectivamente). Estes invadirão as células circundantes e passarão para uma fase de multiplicação rápida, ou seja, tornam-se taquizoítos. Neste estágio, os parasitas se reproduzem assexuadamente por endodiogenia em diferentes tipos de células do hospedeiro, principalmente em macrófagos e monócitos. Quando o número de microorganismos intracelulares se torna excessivo, a célula infectada se rompe e os taquizoítos são liberados para invadir outras células.

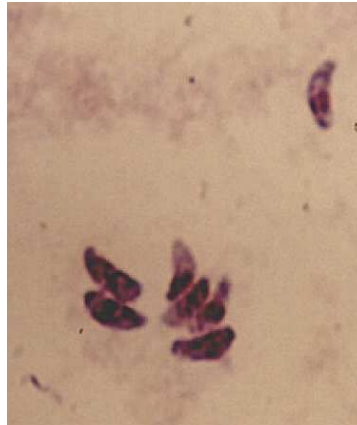


FIGURA 2: Taquizoítos

Após uma breve fase de disseminação sangüínea, o parasita encista-se nos tecidos e, em particular, nos músculos estriados e no cérebro. Os cistos formados permanecem nos tecidos, quase sempre sem causar danos. Estima-se que a persistência dos cistos mantenha uma imunidade durável, não esterelizante, mas protetora de uma nova infecção.

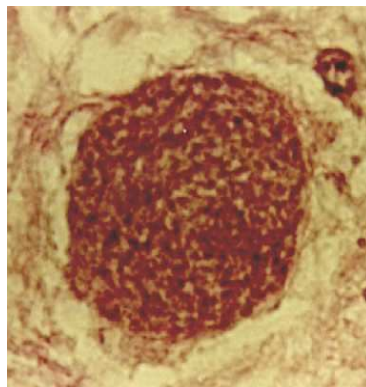


FIGURA 3: Cisto tecidual em cérebro de camundongo contendo bradizoítos

No ciclo sexuado, nos felinos, a ingestão e o rompimento dos cistos e oocistos ocorre da mesma maneira. Porém, no caso da ingestão de cistos teciduais, os bradizoítos liberados no intestino iniciam imediatamente uma fase de proliferação assexual. Ao final desse estágio de proliferação inicia-se a fase de reprodução sexual, resultando na formação de oocistos. No meio externo este oocisto esporula (FIGURA 5) e passa ter dois esporocistos, fase inicial da esporulação, com quatro esporozoítos e um corpo residual.

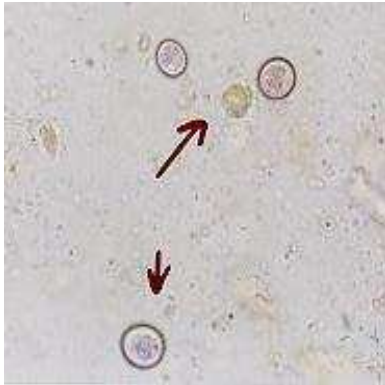


FIGURA 4: Oocisto Imaturo



FIGURA 5: Oocisto esporulado

Os felídeos são os únicos hospedeiros completos, pois na ingestão de oocistos esporulados, os esporozoítas liberados iniciam primeiro uma fase de multiplicação assexual em tecidos extraintestinais (funcionariam primeiramente como hospedeiros intermediários). No decorrer desta multiplicação, alguns parasitas migram para o tecido intestinal e inicia-se a fase de reprodução sexual (passando a funcionar como hospedeiros definitivos), originando os oocistos. Entre três a dez dias após a contaminação o gato começa a liberar os oocistos imaturos nas fezes, ao longo de até 14 dias.

A esporulação ocorre no meio ambiente e depende da umidade e temperatura. Normalmente, os gatos só eliminam oocistos na primo-infecção, podendo ocorrer reexcreção após imunossupressão, principalmente em animais com o vírus da imunodeficiência felina (ARAÚJO, 1998).

A importância epidemiológica do oocisto está na sua resistência e sobrevivência no ambiente, podendo estar viável por até dois anos em condições ambientais e mais que 54 meses em laboratório (TENTER *et al.*, 2000).

Embora os cistos teciduais sejam menos resistentes que os oocistos em condições ambientais, a sua capacidade de resistência a mudanças de temperaturas é relativamente alta, chegando a manter-se infectante em carne refrigerada a uma temperatura de 1-4° C por mais de 3 semanas. Em contrapartida, os cistos teciduais são mortos por aquecimento a uma temperatura de 67° C.

A infecção do hospedeiro definitivo pode ocorrer pela ingestão de cistos teciduais presentes no hospedeiro intermediário ou pela ingestão de oocistos esporulados. Já os hospedeiros intermediários além da possibilidade de se infectarem da mesma forma, podem ainda se contaminar por via congênita.

A transmissão do *T. gondii* para o homem pode ocorrer pela ingestão de oocistos na água, em alimentos contaminados e geofagia, pela ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal passada ou ainda por transmissão congênita ou por transfusões sanguíneas.

A transmissão do *T. gondii* na sua forma de taquizoíta através do leite materno pode ocorrer, embora seja extremamente raro, quando a mãe está em fase parasitêmica. Além do sangue e do leite, taquizoítos foram encontrados em outros fluidos corporais como saliva, urina, lágrimas e sêmen, porém sem evidências de que sejam vias epidemiologicamente importantes de transmissão (TENTER *et al.*, 2000).

Atividades como jardinagem, sem a devida proteção para as mãos, podem ser um meio de contaminação. Além disso, a contaminação com oocistos no solo, feno, palha e grãos, é uma fonte de infecção para animais que poderão ser ingeridos pelo homem. Também foi levantada a possibilidade do pêlo dos cachorros serem vetor na transmissão de oocistos para humanos, uma vez que esses entram em contato com solo contaminado com fezes de gatos. Os felídeos, por sua vez, não necessariamente transmitem o agente patogênico pelo contato direto, devido seus cuidadosos hábitos de limpeza (MARTINS & VIANA, 1998).

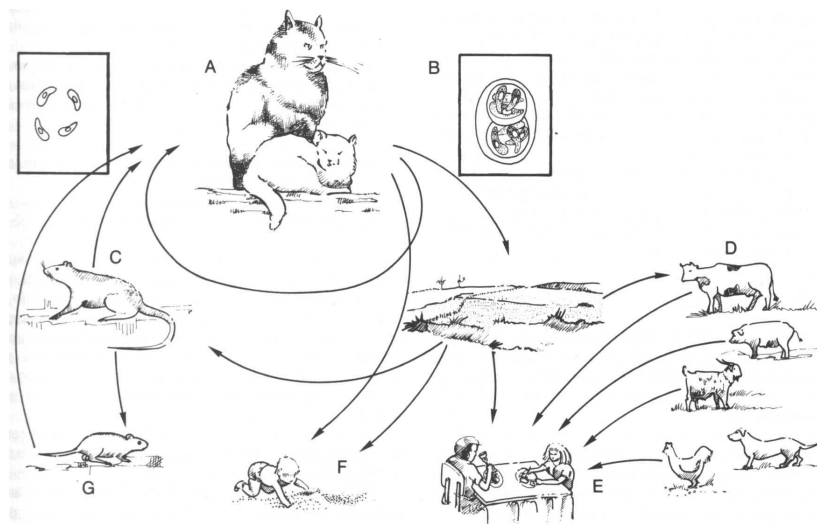


FIGURA 6: Mecanismos de contaminação dos hospedeiros definitivos e intermediários

Fonte: Rey, 1992.

Durante os últimos anos passou a ser concedida maior importância médica à toxoplasmose, porque os estudos sobre esta afecção demonstram que a patologia é

realmente um problema comum e não uma simples doença excepcionalmente diagnosticada (TENTER *et al.*, 2000), sendo considerada de aspecto endêmico, traduzido pela elevada prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* na população mundial.

A toxoplasmose adquirida em indivíduos imunocompetentes pode cursar de forma subclínica, na maioria dos casos, ou de forma clínica. Geralmente é assintomática ou com sintomatologia leve. As manifestações clínicas mais freqüentes são adenomegalias, febre, mal-estar, astenia, mialgia, exantema maculopapular, odinofagia e hepatoesplenomegalia. Manifestações severas como encefalite, miocardite, hepatite podem ocorrer, mas são raríssimas em indivíduos imunocompetentes (AFEP, 1997). Em 15 a 20% dos casos pode-se observar adenopatia, febre moderada e astenia (DUBEY, 1968; ODY, 1993). Esta primoinfecção suscita rapidamente uma resposta imunitária humoral e celular, permitindo controlar a infecção aguda. Em hospedeiros imunocompetentes a infecção resulta, normalmente, em imunidade contra o *T. gondii* por um longo período de tempo.

Formas graves da toxoplasmose, com sintomas mais severos, podem ser observadas em duas situações: infecção intra-uterina (congênita); e em primoinfecção ou reagudização em indivíduos imunocomprometidos, grupo onde incluem-se os transplantados, indivíduos em tratamento quimioterápico e portadores de HIV (CONTRERAS *et al.*, 1996).

A toxoplasmose congênita ocorre quando a mulher adquire o protozoário, pela primeira vez, durante a gestação e o transmite para o feto. A gravidade das lesões vai depender da data da contaminação materna (DESMONTS & COUVREY, 1986; HOHLFELD *et al.*, 1994; PRATLONG *et al.*, 1996). A probabilidade de transmissão do parasita é menor quando a infecção é adquirida pela mãe no início da gestação, pois o fluxo sangüíneo placentário é menor (10% - 15%). No entanto, a gravidade da toxoplasmose congênita é maior neste período e 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 é mais freqüente (30%), mas as lesões são menos graves. No terceiro trimestre o risco de contaminação é ainda maior (60%), mas geralmente os recém-natos não apresentam sinais da doença congênita. Porém, qualquer que seja a data da contaminação fetal, os cistos são formados nos tecidos e o risco de reagudização posterior é importante, com a possibilidade de haver, nestes casos, coriorenite

(ENGSTROM *et al.*, 1991). Em humanos, o problema social decorrente deste tipo de infecção é bastante sério. As manifestações clínicas da toxoplasmose congênita variam de coriorretinite, estrabismo, cegueira, retardo mental e/ou motor, anemia, icterícia, exantema, petéquias, encefalite, pneumonite, microcefalia, hidrocefalia, calcificações cerebrais a hepatoesplenomegalia, podendo ocorrer aborto (NOGUEIRA; MOREIRA; PEREIRA, 1996). A clássica tétrede de Sabin da toxoplasmose congênita inclui microcefalia (com ou sem hidrocefalia), calcificação intracranial, coriorretinite e retardo mental, tendo como indicador externo macroencéfalo com fontanelas dilatadas (RÖSE, 1997). Nas gestações subsequentes a mãe já adquiriu anticorpos e as gestações são normais.

Mulheres imunocomprometidas por SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) ou por lupus eritematoso sistêmico (SLE) previamente infectadas podem transmitir o agente patogênico congenitamente devido à queda da imunidade destas pacientes (TENTER *et al.*, 2000).

Nos indivíduos imunocomprometidos a defesa imunitária do hospedeiro parece ser incapaz de controlar a multiplicação dos taquizoítos, e observa-se então uma multiplicação rápida dos parasitas levando a necroses tissulares focalizadas e uma eventual disseminação por via sangüínea. Em pacientes imunocomprometidos a toxoplasmose adquirida perde seu caráter clínico autolimitado e benigno, especialmente se a resposta imune mediada por célula estiver debilitada, ocorrendo sua disseminação pelo organismo (ISRAELSKI & REMINGTON, 1993). As lesões observadas são principalmente cerebrais, caracterizadas por sinais neurológicos, podendo haver também uma generalização. As manifestações clínicas nestes casos podem ser meningite, encefalite, abscessos cerebrais, lesões oculares, alterações no sistema nervoso central, miocardites, pneumonia e pancreatite (ARNOLD, 1997). Em pacientes HIV positivos a toxoplasmose tem sido uma causa de óbito com índices bastante elevados (LEPORT & REMINGTON, 1992; DEROUIN *et al.*, 1992).

Recentemente vem sendo dado destaque para a toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos em duas diferentes situações: toxoplasmose após transplante e toxoplasmose em indivíduos portadores de HIV (SILVESTRE, 2000).

Tanto em transplante de órgãos como de medula, o indivíduo pode ser portador crônico e, por imunossupressão, reativar a infecção, ou ocorrer infecção primária severa por cistos teciduais do órgão transplantado. Neste caso, a infecção manifesta-se semelhantemente à toxoplasmose congênita. Quando ocorre

reativação da infecção após o transplante devido à imunodepressão, a doença se dissemina, apresentando encefalite, miocardite, pneumonite e calcificações cerebrais (ARNOLD, 1997).

A gravidade da toxoplasmose em pacientes com AIDS decorre da reativação da infecção crônica quando os níveis de CD4 estão abaixo de 300/mm³. O órgão mais atingido é o cérebro, o sistema nervoso central, com apresentação de encefalite toxoplásmica, alterações do sensório, incoordenação motora, ataxia, cefaléia, vômitos, alteração no nível de consciência e convulsões (NOGUEIRA; MOREIRA; PEREIRA, 1996).

Também é importante frisar que em pacientes com câncer, a toxoplasmose pode ocorrer pela reagudização da cepa latente, provavelmente pela ação das drogas imunossupressoras que são usadas no tratamento das malignidades. Os pacientes acometidos por neoplasias recebem tratamento imunodepressivo constituído de corticosteróides, agentes alquilantes, antimetabólitos, radioterapia e quimioterapia. Se não for tratada, a toxoplasmose nestes pacientes, pode ser fatal.

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser clínico, embora um tanto difícil pela característica assintomática da patologia. Em muitos casos pode assemelhar-se a outras doenças (mononucleose). O diagnóstico definitivo é feito pela demonstração do parasita. No entanto, a pesquisa pelo exame direto é difícil e deve, freqüentemente, ser complementada por métodos indiretos tais como inoculação em animais de laboratório ou cultura celular. Desta maneira se faz necessário a utilização de técnicas sorológicas (DEROUIN & GARIN, 1992).

Na maioria dos casos, a sorologia representa a base do diagnóstico e do controle da toxoplasmose. A presença de anticorpos específicos permite diagnosticar uma infecção por *T. gondii*. Anticorpos específicos das classes IgM, IgA, IgE e IgG são produzidos em resposta à infecção pelo *T. gondii*, sendo que as IgM, IgA e IgE aperecem antes da IgG, porém na maioria dos indivíduos duram até seis meses e a IgG permanece por toda a vida (NOGUEIRA, MOREIRA, PEREIRA, 1996).

As técnicas sorológicas habitualmente utilizadas para o diagnóstico da toxoplasmose são: Dye test, Imunofluorescência Indireta (IFI), Aglutinação Direta, ISAGA e Enzime-Linked Imunosorbent Assay (ELISA indireta clássica) (DESMONTS *et al.*, 1981, 1985; DEROUIN *et al.*, 1991; CHOI *et al.*, 1992). Recentemente, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi adaptada para o diagnóstico

da toxoplasmose, utilizando genes únicos (P30) ou repetidos (gene B1, seqüência TGR1E). Todas as técnicas de PCR são de grande sensibilidade e especificidade, permitindo detectar um só parasita. 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; PRATLONG, 1996).

Por esta razão, duas técnicas foram selecionadas para o uso neste estudo: a técnica de ELISA Indireta, que será a técnica padronizada; e a técnica de Imunofluorescência Indireta, que será a técnica utilizada como controle (pela facilidade de execução, comercialização de reativos, baixo custo de antígeno e por ser utilizada internacionalmente).

O interesse em padronizar o método de ELISA Indireta se deve a sua fácil execução, rápida realização, custo baixo e leitura automatizada. Por esses motivos, a técnica de ELISA Indireta tem demonstrado mais vantagens que a técnica de IFI, pois esta requer pessoal especializado para a leitura das lâminas, microscópio específico, caro e nem sempre disponível, além de consumir muito mais tempo.

No estado do Paraná poucos são os dados disponíveis na literatura sobre toxoplasmose humana, quer seja na população normal, em indivíduos sujeitos a risco ocupacional, em pacientes imunocomprometidos ou em gestantes. Portanto, este trabalho também visa conhecer a soroprevalência desta doença neste último grupo de pacientes.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Padronizar a técnica de ELISA Indireta para diagnóstico da toxoplasmose em gestantes;
- Estudar comparativamente os resultados obtidos com as técnicas de IFI e ELISA Indireta;
- Determinar especificidade e sensibilidade da técnica de ELISA Indireta;
- Determinar a prevalência de títulos de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em uma população de gestantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. POPULAÇÃO A SER ESTUDADA E OBTENÇÃO DE SOROS

3.1.1. POPULAÇÃO DE MULHERES GESTANTES

Foi realizada coleta de 5ml de sangue, por punção venosa, mediana ou cefálica, de 152 mulheres gestantes, em diferentes estágios gestacionais, que vieram para atendimento no Hospital e Maternidade Nossa Senhora de Fátima de Curitiba, entre os meses de maio e novembro do ano de 2001.

3.1.2. OBTENÇÃO DE SOROS

Os soros para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* foram obtidos após a coleta de aproximadamente 4 ml de sangue, que foram deixados em banho-maria a 37°C por pelo menos meia hora para a separação do soro. Em seguida foram submetidos à centrifugação a 2000 rotações (rpm) durante 10 minutos, sendo o soro recuperado com pipeta e transferido para tubos eppendorf devidamente identificados. As amostras foram armazenadas a 20°C negativos, até sua utilização.

3.2. CEPA RH PADRÃO DE *Toxoplasma gondii* PARA PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS

Os antígenos de *Toxoplasma gondii*, foram produzidos no laboratório de Parasitologia Animal do Departamento de Patologia Básica, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), utilizando a cepa RH padrão (cepa gentilmente cedida pelo professor Dr. Odilon Vidotto do Departamento de Parasitologia da Universidade Estadual de Londrina). O cultivo da cepa (FIGURA 7) foi mantido por passagens intra-peritoniais em camundongos *Mus musculus* fêmeas com 40 dias de idade.

As passagens eram realizadas a cada dois dias, conforme o seguinte procedimento:

- Lavar a cavidade peritoneal com 3ml de soro fisiológico estéril;

- Passar o exsudato obtido em agulha hipodérmica (com o intuito de romper macrófagos que continham taquizoítos);
- Centrifugar a 630 rpm, durante 10 minutos, em temperatura de 4 a 8 °C (para sedimentar as células do hospedeiro);
- Recuperar o sobrenadante;
- Centrifugar a 2.600 rpm, durante 10 minutos, em temperatura de 4 a 8 °C (para sedimentar os taquizoítos);
- Recuperar o sedimento;
- Ressuspender em cerca de 10ml de PBS estéril – pH 7,2;
- Retirar parte dessa solução e reinocular em outros camundongos (0,5 ml por camundongo) para manutenção da cepa.
- Centrifugar a 2.600 rpm, por 10 minutos, em temperatura de 4 a 8 °C.

O sedimento resultante constituía o material para a preparação dos antígenos para as duas técnicas sorológicas.

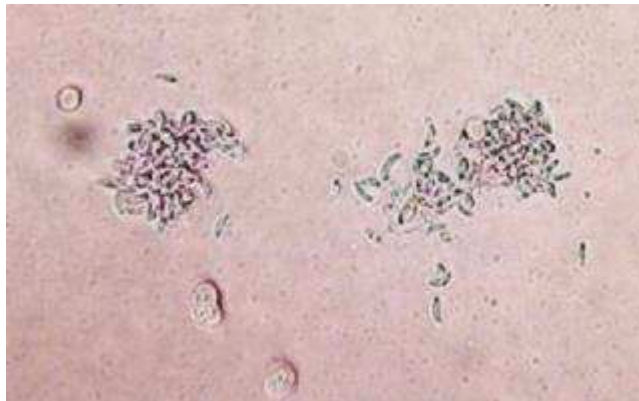


FIGURA 7 – Cultivo da Cepa RH padrão de *T. gondii*

3.3. TÉCNICAS SOROLÓGICAS

3.3.1. TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – IFI

O princípio da técnica de IFI é uma reação antígeno anticorpo. Esta reação é visualizada pela adição de um anti-anticorpo (antiglobulina) acoplado à fluoresceína, que absorve luz azul (490nm) e emite uma intensa fluorescência amarelo-verde. A reação será tanto mais intensa quanto maior for a quantidade de anticorpos específicos no soro avaliado.

Essa reação é classicamente empregada para o estudo da toxoplasmose (CAMARGO *et al.*, 1976; DESMONTS & COUVREY, 1986; DUBEY & BEATTLE, 1988; FREIRE *et al.*, 1991; VIDOTTO, 1992; PRATLONG *et al.*, 1994).

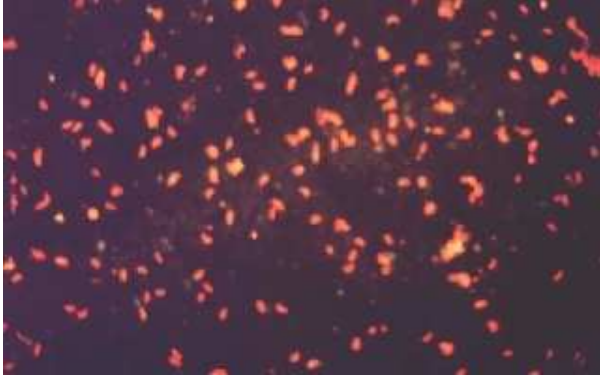


FIGURA 08 – IFI não reagente

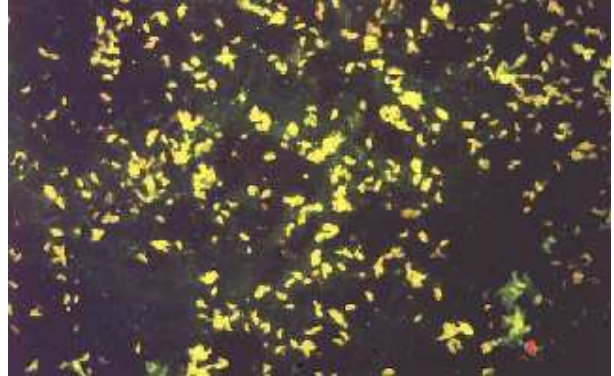


FIGURA 09 – IFI reagente

3.3.1.1. Soluções

Tampão PBS – pH 7,2:

- 8,77g de cloreto de sódio (NaCl) PA 0,15M
- 1,92g de fosfato de sódio dibásico Anidro (Na₂HPO₄) PA 0,0072M
- 0,39g de fosfato de sódio monobásico Anidro (NaH₂PO₄) PA 0,0028M
- 1000ml de água destilada (q.s.p.)

Misturar e acertar o pH.

Azul de Evans Diluído:

- 1ml de solução mãe de Azul de Evans
- 49ml de Tampão PBS – pH 7,2

3.3.1.2. Antígeno

A partir do sedimento contendo os taquizoítos resultante do procedimento descrito no item 3.2. era produzido o antígeno íntegro para o método de IFI, conforme o seguinte procedimento:

- Ressuspender em cerca de 10ml de tampão PBS estéril - pH 7,2;
- Realizar contagem de taquizoítos íntegros em câmara de Thoma, até obter a quantidade de taquizoítos desejada (2 taquizoítos por quadrado maior). Caso a quantidade esteja maior acrescenta-se tampão PBS, caso esteja

menor centrifuga-se novamente e ressuspende em quantidade menor de tampão PBS;

- Acrescentar ao resultado 50% do volume final de Formalina 2%;
- Sensibilizar a lâmina com antígeno (20 μ l/spot);
- Deixar sedimentar por 15 min;
- Armazenar a lâmina em estufa a 37°C por 2h;

Com isso esperava-se a concentração de aproximadamente 150 taquizoítos por campo no microscópio ótico no aumento de 400x.

As lâminas prontas eram então armazenadas, em caixa de vidro cobertas por papel de alumínio, no freezer (-20°C) até sua utilização.

3.3.1.3. Soros

Os soros foram diluídos em tampão PBS, e foram utilizados nas diluições de 1:16 e 1:32 em primeira instância para a triagem. Os soros que se apresentaram positivos na maior diluição foram depois utilizados nas diluições de 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024, para a titulação.

3.3.1.4. Conjugado

O conjugado utilizado no presente trabalho foi anti-IgG humano marcado com fluoresceína, comercializado pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Bio-Manguinhos).

O conjugado foi diluído em Azul de Evans Diluído, sendo utilizado em diluição 1:80.

3.3.1.5. Procedimento

- Retirar as lâminas do freezer;
- Secar com auxílio de ventilador;
- Diluir os soros;
- Depositar 20 μ l de cada diluição dos soros, e dos controles, na lâmina;
- Colocar a lâmina em câmara úmida;
- Incubar a 37°C por 30 min;
- Depositar as lâminas, em posição vertical, em banho de PBS por 10 min;
- Enxaguar com água destilada;

- Secar com auxílio de ventilador;
- Preparar o conjugado;
- Colocar 20µl do conjugado em cada *spot*;
- Colocar a lâmina em câmara úmida;
- Incubar a 37°C por 30 min;
- Depositar as lâminas, em posição vertical, em banho de PBS por 10 min;
- Enxaguar com água destilada;
- Secar com auxílio de ventilador;
- Depositar solução de glicerina entre as fileiras da lâmina;
- Cobrir com lamínula;
- Realizar leitura em microscópio para imunofluorescência (fotomicroscópio) em aumento de 400x.

3.3.2. TÉCNICA DE ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO – ELISA INDIRETO

O princípio da técnica de ELISA é uma reação de cor. A reação enzima-substrato e a formação do produto colorido ocorrem da seguinte maneira: a peroxidase, presente no sistema, atua sobre o peróxido de hidrogênio, catalisando a liberação de oxigênio atômico ($1/2$). O cromógeno, no caso, o OPD (ortofenilenodiamino), que é incolor em seu estado reduzido, ao reagir com o oxigênio liberado, oxida-se, adquirindo coloração amarela. Para que haja a 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 e seguem até a aferição da cor pelo leitor de ELISA.

A técnica de enzimaensaio (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays - ELISA) tem sido muito empregada para análise imunológica de moléculas de parasitas. Devido a sua alta sensibilidade e praticidade foi a técnica escolhida no presente trabalho. Foi utilizada a técnica de ENGVALL *et al.* (1972) adaptada para microplacas de poliestireno. A padronização da técnica foi realizada mediante avaliação de diferentes concentrações do soro, do conjugado e do antígeno, levando-se em conta as reações inespecíficas e a reatividade do sistema, asseguradas pelos soros padrão negativo e positivo.

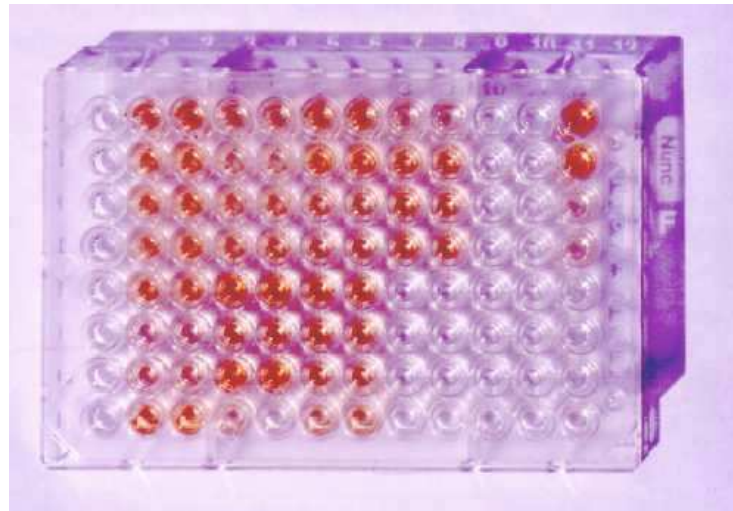


FIGURA 10 – Placa de ELISA

3.3.2.1. Soluções

Coating Buffer:

Tampão carbonato 0,005M.

* Solução A

- 1,1g de carbonato de sódio (Na_2CO_3)
- 200ml de água deionizada

* Solução B

- 4,2g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3)
- 1000ml de água deionizada

Acertar o pH para 9,6 adicionando a solução A na solução B.

Solução de Bloqueio da Placa:

Caseína 2% em PBS.

Constituição do PBS 0,05M com 0,15M de cloreto de sódio (NaCl) pH 7,4:

* Solução A

- 7,1g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (ou 10,82g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
- 8,8g de cloreto de sódio (NaCl)
- 1000ml de água destilada q.s.p.

* Solução B

- 1,4g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)
- 1,88g de cloreto de sódio (NaCl)
- 200ml de água destilada q.s.p.

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

Solução de Lavagem:

- 9g de cloreto de sódio (NaCl)
- 0,5ml de Tween 20
- 1000ml de água destilada q.s.p.

Dissolver o NaCl e depois adicionar o Tween 20.

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
- 500ml de PBS q.s.p.

Tampão Citrato:

- 7,1g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (ou 13,4g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 5,19g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
- 1000ml de água destilada q.s.p.

Solução Substrato - OPD 2mg:

- 2mg de Orto-fenileno-diamino (OPD)
- 2 μl de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
- 10ml de tampão citrato pH 5,0

A solução substrato deve ser preparada no momento da utilização.

- Pipetar o tampão citrato;

- Adicionar o OPD e deixar o recipiente ao abrigo da luz até a dissolução do OPD;
- Adicionar o H₂O₂.

Solução de Bloqueio da Reação:

- 1ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄)
- 19ml de água destilada

3.3.2.2. Antígeno

Quando o sedimento contendo os taquizoítos resultante do procedimento descrito no item 3.2. não era utilizado para a produção de antígeno íntegro para o método de IFI, era armazenado em freezer (-20°C). A partir destes sedimentos armazenados foi produzido o antígeno diluído para a técnica de ELISA, conforme o seguinte procedimento:

- Descongelar e juntar todos os sedimentos armazenados;
- Centrifugar a 3500 rpm, por 20 min, em temperatura de 4 a 8°C;
- Recuperar o sedimento;
- Adicionar água destilada (menos da metade do volume do sedimento);
- Proceder, 5 vezes, os ciclos de congelamento e descongelamento rápido:
 - Congelar em Nitrogênio líquido por 5 min,
 - Descongelar imediatamente em banho Maria, com água a 37°C;
- Passar para tubo de vidro;
- Submeter o antígeno ao ultra-som (20KHz - 1mA, 80 ciclos/min), efetuando 5 séries de 30s com intervalos de 1 min (conservando no gelo);
- Centrifugar o antígeno a 10.000 rpm, por 30 min, de 4 a 8°C;
- Recuperar o sobrenadante, (se houver sedimento repetir as primeiras centrifugações e os ciclos de congelamento);
- Filtrar em filtro bacteriano 0,22;
- Determinar a concentração de proteínas, pelo método de Lowry (1951);
- Armazenar o antígeno, aliqüotado em tubos eppendorf, a -20°C.

3.3.2.3. Dosagem de proteínas pelo método Lowry et al. (1951)

* 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 min em temperatura ambiente.

* Preparar o reagente B

- 1 volume do Reagente de Folin,
- 2 volumes de água destilada.

* Procedimento

- Adicionar água destilada em 11 tubos de ensaio;
- Adicionar a amostra (em duplicata) nos tubos de 1 a 6;
- Adicionar o padrão de soroalbumina bovina (BSA) nos tubos de 7 a 10;
- Homogeneizar em vortex;
- Adicionar o reagente A, homogeneizar em vortex e aguardar 10 min;
- Adicionar o reagente B, homogeneizar em vortex e aguardar 10 min;
- Proceder a leitura em espectrofotômetro em 660nm imediatamente.

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 7 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 11 é o branco controle.

3.3.2.4. Soros

Os soros foram obtidos como descrito no item 3.1.2. e diluídos em tampão de incubação.

Foram utilizados soros comprovadamente positivos (Controle Positivo) e soros comprovadamente negativos (Controle negativo), cedidos pelo Laboratório Central do Estado – LACEN.

3.3.2.5. Conjugado

O conjugado utilizado no presente trabalho foi anti-IgG humano acoplado a enzima peroxidase, comercializado pelo laboratório SIGMA.

O conjugado foi diluído em tampão de incubação, sendo utilizado em diluição 1:5000.

3.3.2.6. Procedimento

- Diluir o antígeno em solução de *coating buffer* (300ng/well);
- Sensibilizar a placa com o antígeno (100µl/well);
- Armazenar a placa a 4°C “over night” ou a 37°C por 3h;
- Lavar a placa com solução de lavagem (2x);
- Bloquear a placa com solução de bloqueio (100µl/well);
- Incubar a placa em estufa a 37°C por 1 hora;
- Lavar a placa com solução de lavagem (2x);
- Adicionar as amostras de soro a serem testados e os controles (100µl/well);
- Incubar a placa em estufa a 37°C por 1 hora;
- Lavar a placa com solução de lavagem (6x);
- Adicionar o conjugado (100µl/well);
- Incubar a placa em estufa a 37°C por 1 hora;
- Lavar a placa com solução de lavagem (6x);
- Adicionar a solução substrato (100µl/well);
- Armazenar a placa em local escuro por 15 min;
- Interromper pela adição de solução de parada da reação (50µl/well);
- Realizar a leitura (em leitor de ELISA, com filtro de 492nm).

3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Testes para avaliação da Sensibilidade (Co-positividade) e Especificidade (Co-negatividade) da técnica de ELISA Indireta em relação à técnica de IFI:

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

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

Onde :

a= número de positivos nas duas técnicas;

b= número de negativos nas duas técnicas;

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

d= número de positivos em ELISA e negativos em IFI.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELISA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE EM GESTANTES

4.1.1. ANTÍGENO

O antígeno solúvel de *T. gondii* para a técnica de enzimaensaio indireto (ELISA Indireta) foi produzido como descrito no item 3.3.2.2., e sua concentração protéica foi dosada pelo método de Lowry *et al.* (1951) como descrito no item 3.3.2.3., resultando numa concentração de 0,958mg/ml.

Para a padronização da melhor concentração protéica a ser utilizada na técnica de ELISA Indireta foram avaliados dois valores: 150 e 300ng de proteína por *well*. Os resultados não foram satisfatórios com a concentração antigênica de 150ng/*well*, então foi usada a concentração de 300ng/*well*.

4.1.2. SOROS

Para a padronização da melhor diluição dos soros a ser utilizada na técnica de ELISA, foram testadas as diluições de 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. A diluição de 1:100 apresentou os resultados mais satisfatórios, por apresentar boa discriminação dos soros positivos e negativos, passando a ser usada para as análises posteriores.

Todas as amostras foram analisadas em duplicata e o valor final foi a média dos resultados das duplicatas, em densidade óptica (nm).

4.1.3. CONJUGADO

O conjugado foi testado em diluições de 1:5.000, 1:7.500 e 1:10.000, também a fim de estabelecer a melhor diluição a ser utilizada no trabalho. Visto que os resultados foram satisfatórios somente na diluição de 1:5.000, esta foi a usada para o presente trabalho

Sendo assim, a técnica ficou padronizada em 300ng/*well* de antígeno, soro na diluição de 1:100 e conjugado em 1:5.000, por estes valores permitirem melhor discriminação entre soros positivos e negativos e resultados satisfatórios.

Vale ressaltar que é extremamente importante o cuidado na conservação de reativos, antígeno, soros e conjugado, assim como na preparação de soluções, pois pequenas alterações nos reagentes podem levar a variações nos resultados.

4.1.4. CUT-OFF

Os exames imunológicos podem ser apenas qualitativos, que indicam reação, ou quantitativos, onde o resultado é dado por valores, que se exprime em título.

O *cut-off*, ou ponto de corte, vem a ser o valor utilizado para discriminar soros com títulos positivo e negativo. Como os resultados de exames sorológicos têm valor diagnóstico de probabilidade, quanto mais o resultado positivo se distanciar do valor do *cut-off*, ou seja, quanto mais alto o título, maior a probabilidade de que corresponda a doença. Da mesma forma para os valores negativos, porém inversamente, ou seja, quanto mais baixo o título, menor a probabilidade de que corresponda a doença.

Para determinar o valor do *cut-off* foram utilizadas 26 amostras de soros comprovadamente negativos (Controles negativos), cedidos pelo Laboratório Central do Estado – LACEN. Os resultados se encontram no ANEXO 1.

Para chegar ao valor do *cut-off* foram calculadas as médias das densidades óticas (M) e a esse valor foi acrescido duas vezes o valor do desvio padrão (DP), resultando em:

$$* \text{CUT-OFF} = M + 2x \text{ DP} = 0,0725 + 2x (0,0235) = 0,120\text{nm}.$$

Assim os soros de pacientes que apresentavam D.O. acima de 0,120 foram considerados positivos, e abaixo negativos.

4.2. ESTUDO COMPARADO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AS TÉCNICAS DE IFI E ELISA INDIRETA

4.2.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – IFI

Para a técnica de IFI o valor de referência para considerar positivos os soros foi a diluição de 1:64. Este valor de referência foi padronizado pelo laboratório Frischmann Aisengard, de acordo com o conjugado utilizado, para análise de anticorpos IgG nas amostras (SILVESTRE, 2000).

Foram analisadas as 152 amostras, das quais 55 foram consideradas positivas (TABELA 1), resultando em uma soroprevalência de 36,2 % (GRÁFICO 1).

Pacientes com resultados positivos em diluições inferiores ao de referência podem ter tido um primeiro contato com o protozoário e estão em fase latente de infecção ou ser indivíduos que estão no início de uma infecção. Seria necessário a coleta de uma segunda amostra, com intervalo de quatro semanas, para verificar a ocorrência ou não de soroconversão.

Os dados brutos de triagens e titulações por paciente se encontram no ANEXO 2.

4.2.2. ENZIMAIMUNOENSAIO INDIRETO – ELISA INDIRETO

Foram analisadas as mesmas 152 amostras de soros da técnica de IFI, com 69 resultados positivos (TABELA 1), ou seja, soroprevalência de 45,4% (GRÁFICO 1).

As densidades óticas (nm), foram obtidas através do leitor de ELISA, e foram considerados positivos aqueles superiores ao valor do cut-off (0,120).

Os dados brutos de D. O. por paciente se encontram no ANEXO 3.

TABELA 1 – Número de amostras que apresentam título de anticorpos.

	IFI	ELISA
POSITIVOS	55	69
NEGATIVOS	97	83

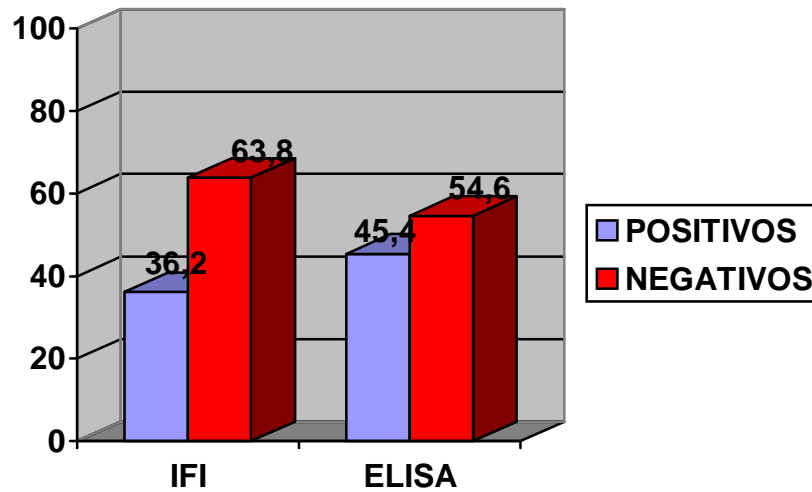


GRÁFICO 1 – Soroprevalência de título de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soros de gestantes, pelas técnicas de Imunofluorescência (IFI) e Enzaimunoensaio indireto (ELISA) (%).

4.2.3. COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS

A comparação entre as duas técnicas (TABELA 2) resultou da análise das 152 amostras de soro. Ambos os testes pesquisaram a presença de IgG nas amostras. Das 152 amostras, 55 (36,2 %) foram positivas para IFI e 69 (45,4 %) foram positivas para ELISA. Esta diferença pode estar relacionada aos tipos de antígenos utilizados em cada técnica, uma vez que na técnica de IFI, utilizou-se antígeno íntegro (antígeno de membrana), enquanto que no método de ELISA utilizou-se antígeno solúvel (citoplasmático). E também pela maior sensibilidade da técnica de ELISA, principalmente nos soros com títulos mais baixos.

TABELA 2 – Comparação entre as técnicas de IFI e ELISA. INDIRETO

IFI / ELISA	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	52	03	55
NEGATIVO	17	80	97
TOTAL	69	83	152

4.3. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS TÉCNICAS

A avaliação de Sensibilidade (Co-positividade) e Especificidade (Co-negatividade) da técnica foi calculada como consta no item 3.4., resultando em:

$$\text{Sensibilidade} = S = \frac{a}{a + c} \times 100 = \frac{52}{52 + 03} \times 100 = 94,55 \%$$

$$\text{Especificidade} = E = \frac{b}{b + d} \times 100 = \frac{80}{80 + 17} \times 100 = 82,50 \%$$

Resultado que leva a uma correlação de 0,70 (70%) entre as duas técnicas. Esta boa correlação demonstra que a padronização da técnica de ELISA está adequada. Trabalhos realizados por nossa equipe (SILVESTRE, 2000; MARQUES, 2001) e outros trabalhos, (CANTOS *et al.*, 2000; DOMINGUES *et al.*, 1998) já haviam demonstrado a boa equivalência entre as duas provas, o que confirma a utilização da prova de ELISA tanto para diagnóstico individual como para estudo epidemiológico.

Mais uma vez vale ressaltar que a diferença entre os tipos de antígenos utilizados em cada técnica e também a maior sensibilidade da técnica de ELISA, podem ter sido os fatores determinantes da diferença entre a quantidade de resultados positivos entre as técnicas.

4.4. PREVALÊNCIA DE TÍTULO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Toxoplasma gondii* EM GESTANTES

Foram analisadas 152 amostras de soros de gestantes, que se encontravam em diferentes estágios gestacionais. Destas, na técnica de Imunofluorescência indireta, 55 amostras (36,20%) apresentaram títulos de anticorpos anti-*T. gondii* na diluição do soro 1:64, sendo considerados positivos (valor de referência); 11 amostras (7,25%) foram consideradas intermediárias (+/- em 1:64) e as demais 86 (56,55%) foram consideradas negativas (- em 1:64) (TABELA 3; GRÁFICO 2).

TABELA 3 – Resultados na técnica de Imunofluorescência indireta em relação ao valor de referência (diluição 1:64)

IFI	POSITIVAS	INTERMEDIÁRIAS	NEGATIVAS
Número de amostras	55	11	86

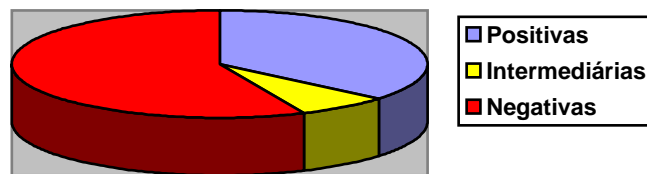


GRÁFICO 2 – Resultado gráfico da técnica de Imunofluorescência indireta, em relação ao valor de referência (1:64) (%).

Nas 55 amostras positivas houve variabilidade na titulação, com 25 amostras com título reagente final em 1:64 (45,45%), 21 em 1:128 (38,20%), 6 em 1:256 (10,90%), 3 em 512 (5,45%) (TABELA 4; GRÁFICO 3).

TABELA 4 – Titulação das amostras positivas na técnica de Imunofluorescência indireta.

TITULAÇÃO	1:64	1:128	1:256	1:512
Número de amostras	25	21	6	3

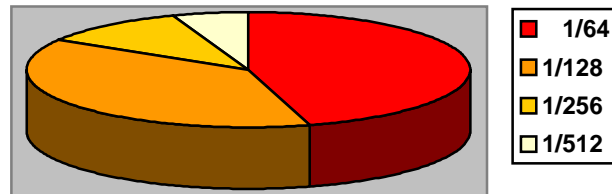


GRÁFICO 3 – Resultado gráfico da titulação das amostras positivas na técnica de Imunofluorescência indireta (%).

A quantidade total de soros também foi analisada pela técnica de Enzimaimunoensaio indireto – ELISA. Resultando em 68 amostras (44,70%) reagentes ao antígeno de *T. gondii*, ou seja, positivas; 3 amostras (2%) consideradas intermediárias; e 81 amostras (53,30%) não reagentes, ou seja, negativas (TABELA 5; GRÁFICO 4). Os resultados são dados com relação ao valor calculado de *cut-off* = 0,120.

TABELA 5 - Resultados na técnica de Enzimaimunoensaio indireto em relação ao valor de *cut-off* (D. O. = 0,120).

ELISA	POSITIVAS (> 0,120)	INTERMEDIÁRIAS (> 0.110 < 0.119)	NEGATIVAS (<0,109)
Número de amostras	68	3	81

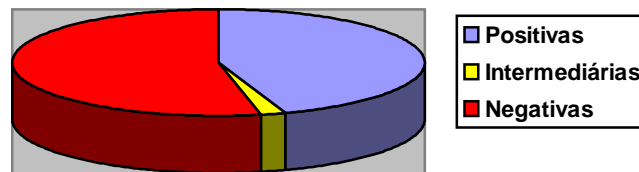


GRÁFICO 2 – Resultado gráfico da técnica de Enzaimunoensaio indireto, em relação ao valor de *cut-off* (0.120) (%).

4.5. DISCUSSÃO

A toxoplasmose congênita ocorre devido a passagem do protozoário da mãe para o feto via placentária. Esta infecção só ocorre quando a mãe faz uma primoinfecção durante a gestação, pois a invasão do parasita no feto só ocorre na fase primária septicêmica da toxoplasmose, ou seja, na invasão dos taquizoítos. Formas crônicas (bradizoítos) não são invasivas.

A população estudada no presente trabalho apresentou um percentual de gestantes com título negativo alto (53,30%, pela técnica de ELISA), ou seja, estas mulheres estão sujeitas ao risco de adquirir toxoplasmose. Estes números não devem ser negligenciados, sendo que em países como a França, onde 80-85% dos indivíduos apresentam título de anticorpos positivo para toxoplasmose, de cada 10.000 gestantes, 80 adquirem toxoplasmose durante a gestação (GOLVAN, 1993).

A toxoplasmose congênita pode ser grave e com manifestações tardias, sendo assim é importante que todas as gestantes com título negativo sejam acompanhadas durante a gestação. Acompanhamento este com a finalidade de exercer tratamento com a maior brevidade, no caso de uma soroconversão. O que deve ser feito através de exames sorológicos, pois como na maioria dos casos a toxoplasmose adquirida é assintomática, a mãe pode não apresentar manifestação clínica.

Visto que o percentual de gestantes a serem acompanhadas é alto, se faz necessário uma triagem, pois as técnicas imunológicas, além de serem caras, não

são acessíveis a maioria da população. Para isto a técnica de ELISA aqui proposta para pesquisa de IgG seria de grande valia, visto que é possível analisar grande número de amostras de uma só vez, sendo que o resultado é automatizado, e que apresenta boa sensibilidade e especificidade. Desta forma a técnica de imunofluorescência seria utilizada, associada à primeira, para confirmação do diagnóstico e titulação do soro.

No caso de sorologia negativa é importante que a imunoglobulina pesquisada seja a IgM, pois indica infecção aguda, permitindo detectar o período da infecção, sendo que a gravidade das lesões dependem do período de contaminação materna. Pelo projeto original deste trabalho, a prevalência desta imunoglobulina deveria também ser estudada, porém não foi possível por complicações na importação de reativos.

Vale ressaltar também que a população deveria ser melhor orientada quanto aos meios de transmissão, a fim de evitar contaminação, principalmente durante o período de gestação.

5. CONCLUSÕES

- A técnica de ELISA Indireta padronizada com concentração de 300ng de antígeno por *well*, diluição do soro em 100 vezes e a diluição do conjugado em 5.000 vezes, permitiu discriminar os soros positivos e negativos, mostrando-se eficiente para o diagnóstico da toxoplasmose;
- A comparação da técnica de ELISA com a técnica de IFI mostrou um índice de copositividade de 94,55 % e um índice de conegatividade de 82,50%. Portanto a técnica de ELISA indireta mostrou-se eficiente para o diagnóstico sorológico de toxoplasmose, mostrando-se até mais sensível que a técnica de IFI;
- A prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em gestantes foi de 36,20% pela técnica de IFI e de 44,70% pela técnica de ELISA Indireta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATO NETO, V. Toxoplasmose. São Paulo: Editora Savier, 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.
- ASSOCIATION FRANÇAISE DES ENSEIGNANTS DE PARASITOLOGIE. Parasitologie – Mycologie ANN O'FEL. 5ª ed. Saint-Maur: Format Utile, p.283-302, 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.
- CAMARGO, M.E.; LESER, P.G.. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II – Evolutive study antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence tests. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 18:227-238, 1976.
- CANTOS, G. A.; PRANDO, M. D.; SIQUEIRA M. V.; TEIXEIRA R. M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. Revista da Associação Médica do Brasil, 46(4): 335-341, 2000.
- 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 Diagn., 12: 119-127, 1992.
- CAZANAVE, J.; CHEYRON, A.; BEGUERT, J.. Improvement of rDna-based PCR assay to detect *Toxoplasma*. Prenatal Diagn., 13: 543, 1993.
- 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.
- 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 1970-1077. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 23: 48-56, 1981.
- DESMONTS, G.; NAOT, Y.; REMINGTON, J. S.. Immunoglobulin M immusorbent agglutination assay for diagnosis of infections diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. Journal Clin. Microbiol., 14: 486-491, 1981.
- DESMONTS, G.; COUVREUR, J.; THULLIEZ, P.; SAINT-JOIGNYG, C.. Sérodiagnostic de la toxoplasmose acquise. Des máthodes simples pour des questions précises. Concours Méd., 107(3): 227-234, 1985.
- DESMONTS, G.; COUVREUR, J.. Toxoplasmose congénitale. Estude prospective de l'issue de la grossesse chez 542 femmes atteintes de toxoplasmose acquise en cours de gestation. Sem. Hôp. Paris, 62: 1418-1422, 1986.
- DOMINGUES, L. M. ; MACHADO R. Z. ; TINUCCI COSTA M. ; CARVALHO C. S. ; COSTA, A. J. ; MALHEIROS E. B. Canine toxoplasmosis : A comparative evaluation of the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by the indirect immunoenzymatic assay (ELISA) and the indirect immunofluorescence reaction (IFI). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 7(2): 79-85, 1998.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P.. Toxoplasmose of animals and man. Boca Raton. CRC Press., 1-220, 1988.
- ENGSTROM, R. E.; HOLLAND, G. N.; NUSSENBLATT, R. B.; JABS, D. A.. Current practice in the managment ofocular toxoplamosis. Am. J. Ophtalmol., 111: 601-611, 1991.
- ENFVALL, E.; PERLAMANN, P.. Enzyme linbeal Immunosorbent Assay ELISA. Journal Immunol., 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 Anõs del CYTED – Program Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo. 6-10 Outubro, Cancún, México, 1994.
- GOLVAN. Elements de parasitologia médicae. Flammarion, 4^a ed., 570 p., 1993
- GROVER, C. M.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J. S.; BOOTHROYD, J. C.. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. Journal Clin. Microbiol., 28: 2297-2301, 1990.

- 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. N. Engl. J. Med., 331: 695-699, 1994.
- ISRAELSKI, D. M. ; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in patient with cancer. Clinical Infectious Diseases, 17(2): 423-435, 1993.
- JOHNSTONE, A.; THORPE, R.. Immunochemistry in Practica. Blackwell. Scientific Publications, 2^a ed., 1987.
- KUBY, J.. Immunology. 4^a edição, New York: W.H. Freeman and Company, 1995.
- LEPORT, C.; REMINGTON, J. S.. Toxoplasmose au cours du SIDA. Presse Méd., 21: 1165-1171, 1992.
- MARTINS, C. S. ; VIANA, J. A. Toxoplasmose – o que todo profissional de saúde deve saber. Clínica Veterinária, 15: 33-37, 1998.
- NAKANE, P. K.. Peroxidase Labeled Antibody. A New Method of Conjugation. J. Histochem. Cytochem., 22(12): 1084-1091, 1974.
- 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, London, 1993.
- PRATLONG, F.; BOULOT, P.; ISSERT, E.; *et al.*. Fetal diagnosis of toxoplasmosis in 190 women infected during pregnancy. Prenat. Diagn., 14: 191-198, 1994.
- 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.
- REY, L. C.; RAMALHO L. C. Seroprevalence of toxoplasmosis in Fortaleza, Ceará, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 41(3): 171-174, 1999.
- RÖSE, I. Morphology and Disgnostics of human toxoplasmosis. General & Diagnostic Pathology, 142: 257-270, 1997.
- SAVVA, D.; MORRIS, J. C.; JOHNSON, J. D.; HOLLIMAN, R. E. Polimerase chain reaction for detectio of *Toxoplasma gondii*. J. Med. Microbiol.; 32: 25-31, 1990.
- SILVESTRE, F. G. Estudo da incidência/prevalência de toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos por terapia pós-transplante e malignidade. Universidade Federal do Paraná. (Dissertação de Bacharelado), 2000.

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.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. Toxoplasma gondii: from animals to humans. International Journal for parasitology, 30: 1217-1258, 2000.

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.

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

ANEXO 1
CUT-OFF

Tabela de resultados da padronização do Cut-Off:

SORO	MÉDIA (Densidade óptica/nm)
01	0,084
02	0,067
03	0,063
04	0,076
05	0,083
06	0,078
07	0,064
08	0,070
09	0,068
10	0,061
11	0,066
12	0,062
13	0,062
14	0,054
15	0,058
16	0,071
17	0,053
18	0,060
19	0,077
20	0,072
21	0,094
22	0,084
23	0,094
24	0,094
25	0,071
26	0,100
MÉDIA TOTAL	0,0725

Média total = 0,0725

Desvio padrão = 0,0235

Cut-off = 0,120

ANEXO 2

Imunofluorescência Indireta

Tabela dos resultados da técnica de imunofluorescência – IFI:

Triagem - 1:16

1:32 - se (-) - cessam os exames = soro negativo;

- se (+/-) - titula-se em somente mais uma diluição para confirmar a negatividade;

- se (+) - titula-se.

Titulação - 1: 32 / 1:64 / 1:128 / 1:256 / 1:512 / 1:1024

TABELA – Resultados da técnica de IFI

Paciente	DILUIÇÕES							
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	
01	+	+	+	+	+/-	-	-	P
02	-	-						N
03	+	+/-	-					N
04	+	+	+	+/-	-	-	-	P
05	-	-						N
06	-	-						N
07	+	+	+/-	-	-	-	-	I
08	-	-						N
09	-	-						N
10	-	-						N
11	-	-						N
12	+	+	+	+/-	-	-	-	P
13	+/-	-						N
14	+	+	+	+/-	-	-	-	P
15	-	-						N
16	+	+	+	+	+/-	-	-	P
17	+	+/-	-					N
18	+	+	+	+/-	-	-	-	P
19	+	+	+	+	+	+	+/-	P
20	+	+	+	+	+/-	-	-	P
21	+	+	+	+/-	-	-	-	P
22	+	+/-						N
23	+	+	+/-	-	-	-	-	I
24	+	+	+	+	+/-	-	-	P
25	-	-						N
26	-	-						N
27	-	-						N
28	+	+	+/-	-	-	-	-	I
29	+	+	+	+	+	+/-	-	N
30	-	-						N
31	+	+/-						N
32	+	+	+	+/-	-	-	-	P

33	+	+	+	+/-	-	-	-	P
34	+	+/-	-					N
35	+	+	+	+/-	-	-	-	P
36	+	+	+	+	+	+/-	-	P
37	+/-	-						N
38	-	-						N
39	+	+	+	+	+/-	-	-	P
40	-	-						N
41	+	+	+	+	+/-	-	-	P
42	+	+	+	+/-	-	-	-	P
43	-	-						N
44	+	+	+	+/-	-	-	-	P
45	-	-						N
46	-	-						N
47	+/-	-						N
48	-	-						N
49	-	-						N
50	-	-						N
51	-	-						N
52	+	+	+	+	+	+	+/-	P
53	+/-	-						N
54	-	-						N
55	+	+	+	+/-	-	-	-	P
56	+	+	+/-	-	-	-	-	I
57	+	+	+	+	+/-	-	-	P
58	-	-						N
59	+/-	-						N
60	+	+/-	-					N
61	-	-						N
62	+	+	+	+/-	-	-	-	P
63	+	+	+	+	+/-	-	-	P
64	+	+	+	+/-	-	-	-	P
65	+	+	+	+	+	+/-	-	P
66	-	-						N
67	+	+	+	+/-	-	-	-	P
68	+	+	+	+/-	-	-	-	P
69	-	-						N
70	+	+	+	+	+/-	-	-	P
71	+/-	-						N
72	+	+	+	+	+/-	-	-	P
73	-	-						N
74	+	+	+	+/-	-	-	-	P
75	-	-						N
76	+/-	-						N
77	+	+	+	+/-	-	-	-	P
78	+/-	-						N
79	+	+/-	-					N
80	+/-	-						N

81	+/-	-						N
82	+	+	+	+	+/-	-	-	P
83	+	+	+	+	+	+/-	-	P
84	-	-						N
85	+	+	+	+	+/-	-	-	P
86	+	+	+/-	-	-	-	-	I
87	+	+/-	-					N
88	+	+	+	+/-	-	-	-	P
89	-	-						N
90	+	+	+/-	-	-	-	-	I
91	+	+/-	-					N
92	-	-						N
93	+	+	+	+	+/-	-	-	P
94	-	-						N
95	+	+	+	+/-	-	-	-	P
96	+	+	+	+/-	-	-	-	P
97	-	-						N
98	+/-	-						N
99	+	+	+	+/-	-	-	-	P
100	+	+	+	+	+/-	-	-	P
101	+	+	+/-					I
102	+/-	-						N
103	-	-						N
104	+	+/-	-					N
105	-	-						N
106	-	-						N
107	+	+	+	+	+/-	-	-	P
108	-	-						N
109	-	-						N
110	+	+	+/-					I
111	+	+	+/-					I
112	+	+	+/-					I
113	+	+/-	-					N
114	+/-	-						N
115	+	+	+	+	+/-	-	-	P
116	-	-						N
117	+	+	+	+	+	+/-	-	P
118	+	+	+	+/-	-	-	-	P
119	+	+/-	-					N
120	-	-						N
121	+/-	-						N
122	-	-						N
123	+	+	+	+	+/-	-	-	P
124	-	-						N
125	+	+	+	+/-	-	-	-	P
126	+/-	-						N
127	+	+	+/-	-	-	-	-	I
128	+	+/-	-					N

129	-	-						N
130	-	-						N
131	+	+	+	+	+/-	-	-	P
132	-	-						N
133	-	-						N
134	+/-	-						N
135	+	+	+	+	+/-	-	-	P
136	+	+	+	+	+/-	-	-	P
137	+	+	+	+/-	-	-	-	P
138	+	+	+	+/-	-	-	-	P
139	+	+	+	+	+/-	-	-	P
140	+	+/-	-					N
141	+	+	+	+	+	+	+/-	P
142	+	+	+	+	+	+/-	-	P
143	+	+/-	-					N
144	+/-	-						N
145	+	+/-	-					N
146	+/-	-						N
147	-	-						N
148	-	-						N
149	-	-						N
150	-	-						N
151	-	-						N
152	+/-	-						N

ANEXO 3
ELISA Indireto

Tabela dos resultados da técnica de ELISA.

Os resultados são as médias das amostras de soro analisadas em duplicata, sendo expressos em densidade óptica (nm), e considerados positivos ou negativos de acordo com o valor de *cut-off* (0,120).

TABELA – Resultados da técnica de ELISA Indireta.

PACIENTE	MÉDIA (D.O.)	RESULTADO
01	0,424	P
02	0,035	N
03	0,113	II
04	0,270	P
05	0,069	N
06	0,040	N
07	0,175	P
08	0,025	N
09	0,036	N
10	0,051	N
11	0,050	N
12	0,126	P
13	0,038	N
14	0,215	P
15	0,051	N
16	0,278	P
17	0,039	N
18	0,213	P
19	0,360	P
20	0,188	P
21	0,202	P
22	0,150	P
23	0,141	P
24	0,214	P
25	0,039	N
26	0,047	N
27	0,025	N
28	0,208	P
29	0,285	P
30	0,081	N
31	0,129	P
32	0,129	P
33	0,102	N
34	0,061	N
35	0,068	N
36	0,189	P
37	0,038	N

38	0,065	N
39	0,254	P
40	0,043	N
41	0,283	P
42	0,265	P
43	0,042	N
44	0,250	P
45	0,065	N
46	0,043	N
47	0,060	N
48	0,069	N
49	0,031	N
50	0,039	N
51	0,036	N
52	0,688	P
53	0,043	N
54	0,040	N
55	0,184	P
56	0,219	P
57	0,327	P
58	0,041	N
59	0,052	N
60	0,153	P
61	0,056	N
62	0,298	P
63	0,226	P
64	0,210	P
65	0,365	P
66	0,027	N
67	0,259	P
68	0,281	P
69	0,046	N
70	0,424	P
71	0,064	N
72	0,370	P
73	0,039	N
74	0,315	P
75	0,042	N
76	0,038	N
77	0,197	P
78	0,128	P
79	0,179	P
80	0,132	P
81	0,016	N
82	0,340	P
83	0,142	P
84	0,016	N
85	0,278	P

86	0,365	P
87	0,070	N
88	0,193	P
89	0,020	N
90	0,019	N
91	0,165	P
92	0,016	N
93	0,224	P
94	0,046	N
95	0,224	P
96	0,250	P
97	0,019	N
98	0,168	P
99	0,130	P
100	0,180	P
101	0,154	P
102	0,022	N
103	0,044	N
104	0,234	P
105	0,018	N
106	0,015	N
107	0,222	P
108	0,019	N
109	0,015	N
110	0,097	N
111	0,058	N
112	0,194	P
113	0,009	N
114	0,010	N
115	0,182	P
116	0,012	N
117	0,153	P
118	0,144	P
119	0,010	N
120	0,012	N
121	0,010	N
122	0,011	N
123	0,245	P
124	0,009	N
125	0,144	P
126	0,012	N
127	0,014	N
128	0,176	P
129	0,010	N
130	0,012	N
131	0,232	P
132	0,009	N
133	0,013	N

134	0,022	N
135	0,317	P
136	0,158	P
137	0,113	I
138	0,108	N
139	0,224	P
140	0,188	P
141	0,255	P
142	0,264	P
143	0,012	N
144	0,113	I
145	0,008	N
146	0,009	N
147	0,010	N
148	0,010	N
149	0,015	N
150	0,006	N
151	0,015	N
152	0,042	N