

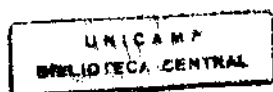
EMÍLIA EMIKO HIEDA TAKAHASHI

**UTILIDADE DA PESQUISA DE ANTICORPOS IgA
ANTI-TOXOPLASMA GONDII PARA O DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA TOXOPLASMOSE AGUDA ADQUIRIDA**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de
Doutor em Clínica Médica.**

Orientador: *Prof.Dr. Cláudio Lucio Rossi*

Campinas, 1996



UNIDADE	RL
N.º CHAMADA:	UNICAMP
T	139u
V	Ex
TOMBO	60727184
PROC.	60727184
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	20/02/96
N.º CPD	

CM-00086461-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP

Takahashi, Emília Emiko Hieda

T139u Utilidade da pesquisa de anticorpos IgA anti-*Toxoplasma gondii* para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda adquirida / Emília Emiko Hieda Takahashi. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Cláudio Lúcio Rossi

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

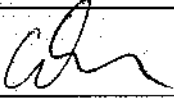
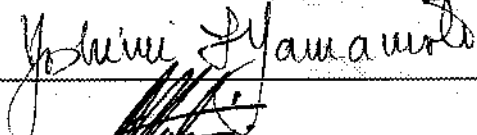
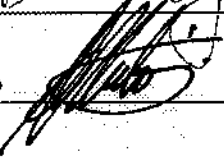
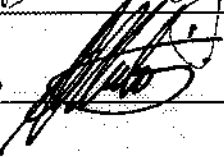
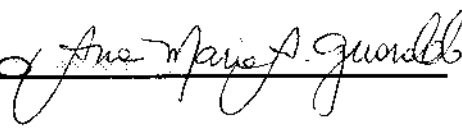
1. Toxoplasmose 2. Testes imunológicos. 3. Imunoglobulina A. I. Rossi, Cláudio Lúcio. II Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof.Dr. Cláudio Lúcio Rossi

Co-orientador:

Membros:

1. Prof. Dr. CLÁUDIO LÚCIO ROSSI 
2. Profa. Dra. YOSHIMI IMOTO YAMAMOTO 
3. Prof. Dr. HEITOR PRADO DE ANDRADE SIVICE 
4. Profa. Dra. SANDRA DEOLÍVIA BOREHO COSTA  sandra ceillia borehocosta
5. Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDI  Ana Maria A. Guaraldi

Curso de pós-graduação de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 08/03/96

**Ao meu esposo Cláudio, pelo incentivo
e compreensão.**

Às minhas filhas, Fernanda e Bianca.

Agradecimentos,

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi, pela orientação, apoio e compreensão.

À Prof^a. Dr^a. Rosângela Junqueira Rocha do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela colaboração no isolamento das formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*.

Aos funcionários da Secção de Imunologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, pela colaboração e estímulo.

À Sílvia Concentina M. Panebianco, secretária do Departamento de Patologia Clínica, pela cooperação.

Ao Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo apoio à realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO..... i

1. INTRODUÇÃO..... 01

2. OBJETIVOS..... 20

3. MATERIAL, MÉTODOS E CASUÍSTICA..... 23

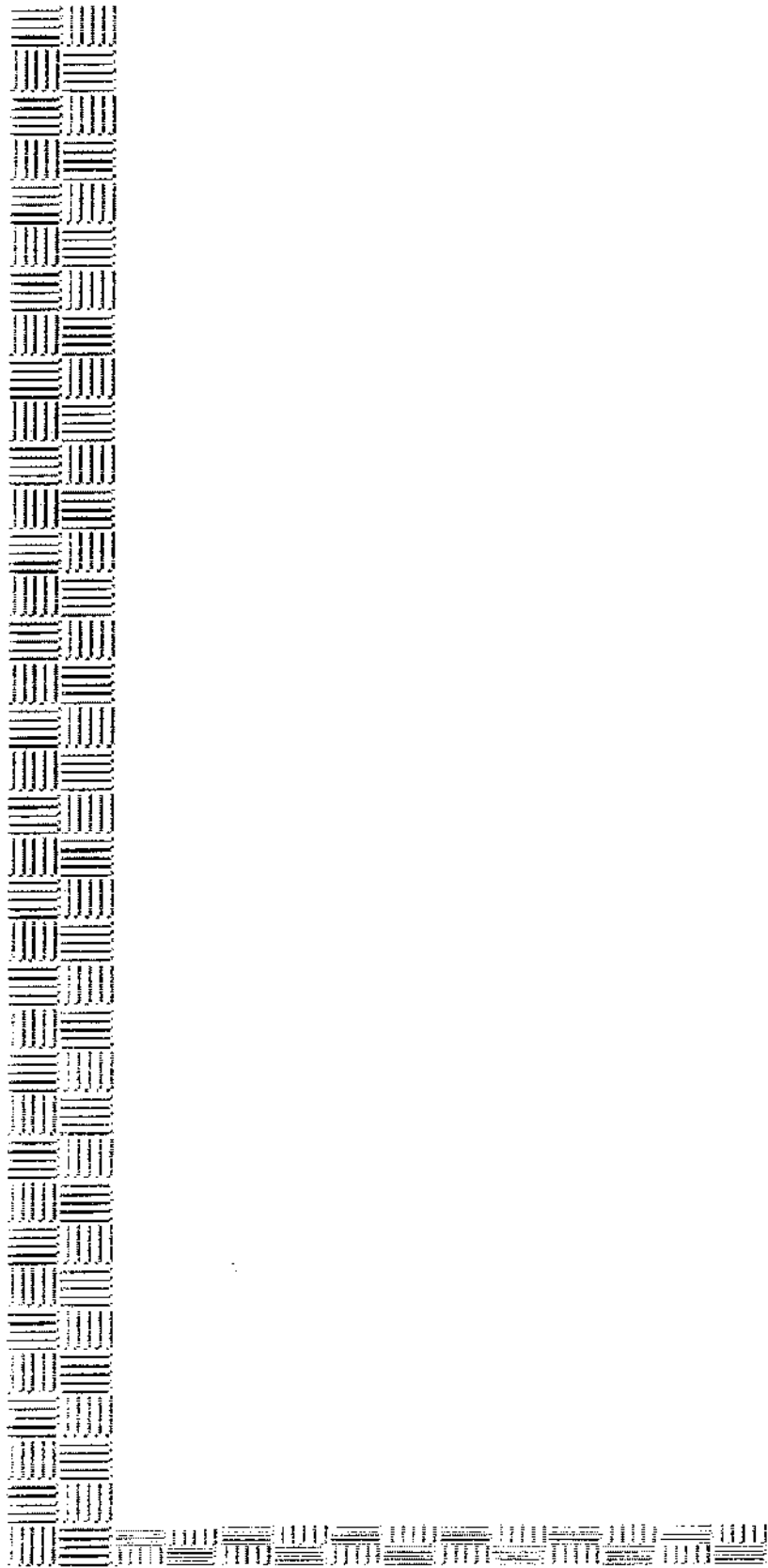
4. RESULTADOS..... 40

5. DISCUSSÃO..... 61

6. CONCLUSÕES..... 76

7. SUMMARY..... 79

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 82



Resumo

A toxoplasmose, infecção causada pelo parasita intracelular *Toxoplasma gondii*, em indivíduos imunocompetentes é, geralmente, assintomática ou se apresenta associada com manifestações clínicas leves e não específicas.

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda tem, tradicionalmente, sido feito pela detecção de anticorpos específicos da classe IgM e/ou pela demonstração de um aumento significativo dos títulos de anticorpos específicos, usualmente da classe IgG. Entretanto, a presença de altos títulos de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em um número significativo de pessoas sadias e a persistência, em alguns casos, dos anticorpos da classe IgM por vários meses, ou mesmo anos, após a infecção com o parasita, tem dificultado a interpretação dos resultados dos testes sorológicos para o diagnóstico da fase aguda da toxoplasmose.

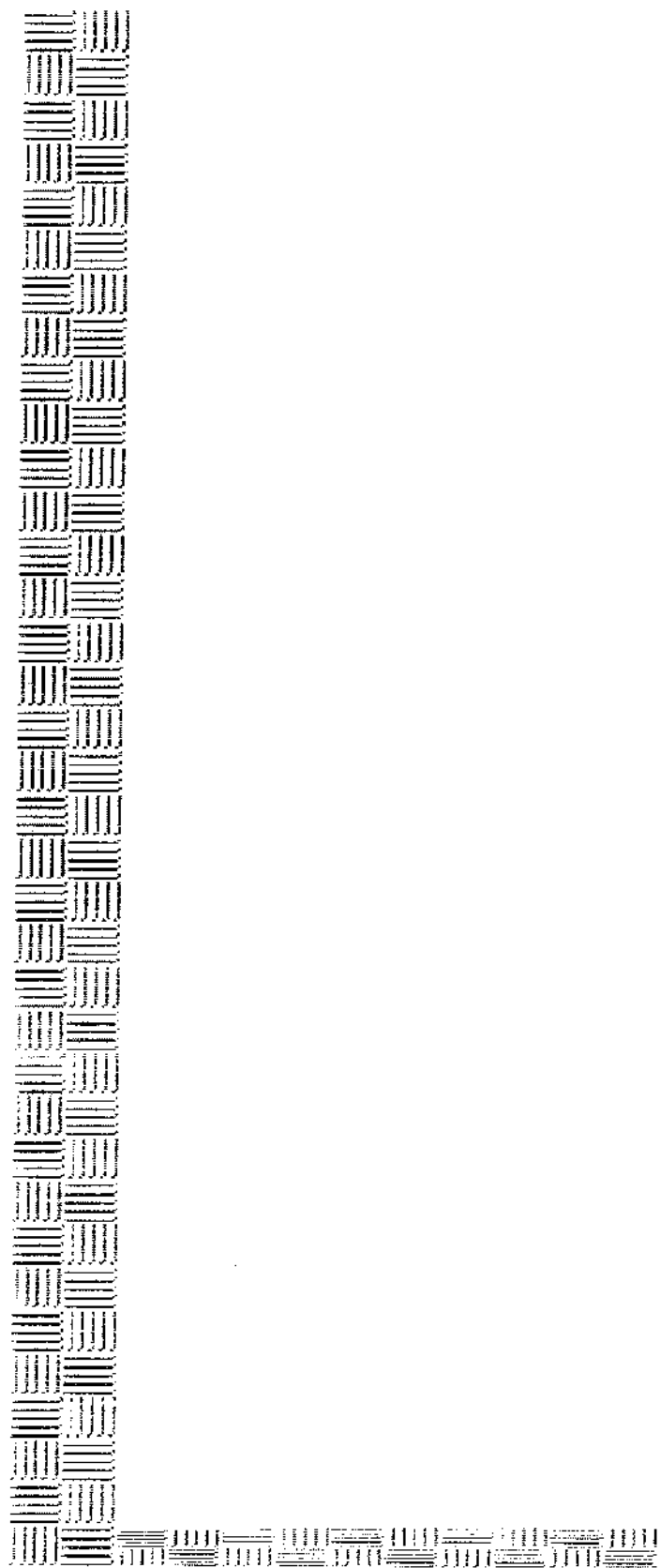
O presente estudo foi delineado para avaliar a utilidade da pesquisa dos anticorpos IgA anti-*T.gondii* para o diagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida.

Anticorpos IgA anti-*T.gondii* foram pesquisados, através das técnicas de ELISA direta (ELISA d), ELISA de captura (ELISAc) e Imunocaptura-aglutinação (IC-A), em 54 pacientes com toxoplasmose aguda adquirida, 50 pacientes com infecções heterólogas e em 27 pessoas sadias. As três técnicas apresentaram alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da toxoplasmose: ELISAd - 98% de sensibilidade e 97% de especificidade; ELISAc-100% de sensibilidade e 99% de especificidade; IC-A-100% de sensibilidade e especificidade.

Através de um estudo comparativo, a persistência dos anticorpos IgA, detectados por ELISAd, ELISAc e IC-A, e a dos anticorpos IgM, detectados por imunofluorescência indireta (IFI), ELISAc e por uma técnica de quimioluminescência baseada em princípios imunoenzimáticos (QmL), foram avaliadas utilizando-se amostras sequenciais de soros de 10 pacientes com toxoplasmose, obtidas a diferentes intervalos de tempo após as manifestações clínicas da infecção. Os resultados da pesquisa de IgM confirmaram as observações de outros autores referentes a longa persistência desta classe de anticorpos específicos após a infecção com o parasita. Foi, ainda, observada uma relação direta entre a sensibilidade da técnica utilizada e a persistência dos anticorpos IgM. Do

mesmo modo, a análise dos resultados referentes a pesquisa de IgA mostrou que as técnicas de ELISAd e IC-A permaneceram, também, positivas por um longo período de tempo após a infecção, em um número significativo de casos. Com relação a identificação da fase aguda da toxoplasmose adquirida através da pesquisa de anticorpos específicos, levando em consideração a frequência de detecção dos anticorpos e a persistência dos mesmos no curso da infecção, os melhores resultados foram obtidos com a técnica de ELISAc para IgA, considerando como significativos níveis de anticorpos superiores a 40 unidades arbitrárias por ml de soro (UA/ml).

A pesquisa de anticorpos IgA por ELISAc associada a pesquisa de anticorpos IgM através de IFI ou de uma técnica de maior sensibilidade tal como ELISAc ou QmL, poderá contribuir significativamente para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda adquirida.



1. Introdução

Toxoplasma gondii é um coccídio parasita do gato. Multiplicação sexual ocorre dentro do epitélio intestinal do hospedeiro felino e, este ciclo enteroepitelial, resulta na formação de oocistos. Quando os oocistos maduros são ingeridos por animais de sangue quente, há liberação das formas taquizoítas que invadem as células do hospedeiro diretamente ou são fagocitadas. A multiplicação intracelular das formas taquizoítas resulta em ruptura das células do hospedeiro e invasão das células contíguas pelos parasitas (FRENKEL, 1973). A destruição das células ocorre até o desenvolvimento da imunidade humoral e celular (COUVREUR & DESMONTS, 1988). Cistos formados dentro das células do hospedeiro são compostos de um conjunto de formas bradizoítas envoltas por uma membrana resistente. Embora encontrados em todos os órgãos, os cistos localizam-se preferencialmente no cérebro e músculos estriados (LUFT & REMINGTON, 1985). A rota natural de transmissão da toxoplasmose para a espécie humana ocorre quando o homem ingere carne contendo cistos ou os oocistos presentes no solo e em comida contaminada. Em mulheres grávidas infectadas com *T.gondii*, o parasita pode ser transmitido para o feto através da placenta (DESMONTS & COUVREUR, 1974a). Infecção através de leite materno tem sido documentada experimentalmente em camundongos e suínos. Outros métodos não usuais de transmissão incluem a transfusão sanguínea, a infecção laboratorial e a transplantação de órgãos (COUVREUR & DESMONTS, 1988; REMINGTON & DESMONTS, 1990).

A grande maioria das pessoas imunocompetentes com infecção toxoplásmica aguda é assintomática ou apresenta manifestações clínicas brandas e não específicas (DORFMAN & REMINGTON, 1973; COUVREUR & DESMONTS, 1988). A linfadenopatia, particularmente a cervical, é a manifestação clínica mais comumente encontrada na fase aguda da toxoplasmose adquirida (McCABE et al, 1987; REMINGTON & DESMONTS, 1990). Os grupos de linfonodos axilares, inguinais e suboccipitais estão, também, frequentemente envolvidos (REMINGTON & DESMONTS, 1990). A adenopatia, geralmente, é localizada, embora em alguns pacientes linfonodos de várias áreas podem estar envolvidos (McCABE et al, 1987; COUVREUR & DESMONTS, 1988; REMINGTON & DESMONTS, 1990). Jones et al (1969), revendo os registros médicos de 38 pacientes com sorologia compatível com a fase aguda da toxoplasmose adquirida, verificaram que 34

(89%) pacientes apresentavam linfadenomegalia. Em 33 pacientes, a linfadenomegalia foi cervical. Linfadenomegalia axilar foi encontrada em 8 pacientes e uma leve linfadenomegalia hilar foi detectada em um dos pacientes, através de um exame radiográfico. Rafaty (1977), revendo os registros médicos de 38 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica, encontrou linfadenopatia cervical em 31 (82%) pacientes. Linfadenopatia axilar e inguinal estavam presentes em, respectivamente, 13 (35%) e 7 (19%) pacientes. Em um dos pacientes, foi detectada linfadenopatia na parede anterior do tórax. Adenopatia em um único sítio estava presente em 24 (62%) pacientes, enquanto que o restante dos pacientes apresentava adenopatia em 2 ou mais sítios. McCabe et al (1987), revendo 20 casos de pacientes com diagnóstico histológico de linfadenopatia toxoplásmica, verificaram que 18 (90%) pacientes apresentavam linfadenopatia nas regiões da cabeça ou do pescoço. Linfadenopatia cervical, axilar e submandibular foram detectadas em, respectivamente, 15 (75%), 6 (30%) e 3 (15%) pacientes. Na fase aguda da toxoplasmose adquirida, além da linfadenopatia, podem ser observadas outras manifestações clínicas não específicas, entre as quais destacam-se: fadiga, mal-estar, febre, dor de cabeça, dor de garganta, perda de peso e mialgia (JONES, KEAN & KIMBALL, 1969; RAFATY, 1977; COUVREUR & DESMONTS, 1988; REMINGTON & DESMONTS, 1990). Casos de toxoplasmose adquirida com envolvimento do baço (JONES, KEAN & KIMBALL, 1969; McCABE et al, 1987) e do fígado (VISCHER, BERNHEIM & ENGELBRECHT, 1967; JONES, KEAN & KIMBALL, 1969; McCABE et al, 1987) também têm sido descritos. Alguns poucos casos de coriorretinite, também, têm sido documentados na infecção aguda adquirida (JONES, KEAN & KIMBALL, 1969; SAARI et al, 1976; MICHELSON et al, 1978; REMINGTON & DESMONTS, 1990).

Diferentemente do que ocorre em pessoas imunocompetentes, *T.gondii* pode causar doença grave em crianças infectadas congenitamente e em pacientes apresentando deficiências do sistema imune, particularmente em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). O espectro clínico da toxoplasmose congênita pode variar desde aparência normal ao nascimento a um quadro de doença grave com envolvimento ocular e cerebral (WILSON et al, 1980; REMINGTON & DESMONTS, 1990). A infecção materna nos primeiros meses de gestação implica em consequências graves para o feto, podendo resultar em aborto ou morte da criança logo após o nascimento

(DESMONTS & COUVREUR, 1974a; DESMONTS & COUVREUR, 1974b; REMINGTON & DESMONTS, 1990). Com relação aos pacientes com SIDA, uma das complicações mais graves é a encefalite causada por *T.gondii* (HOROWITZ et al, 1983; HOLLIMAN, 1988). Encefalite toxoplásmica tem sido registrada em 3% a 40% dos pacientes com SIDA, sendo, possivelmente, a infecção mais comum do sistema nervoso central (LUFT & REMINGTON, 1988).

A suspeita clínica de toxoplasmose adquirida ou congênita pode ser confirmada através dos seguintes métodos laboratoriais:

1. Isolamento do *T.gondii* a partir de extratos de tecidos ou fluídos do corpo.

As tentativas de isolamento do parasita são, geralmente, realizadas pela inoculação do material suspeito em camundongos (ABBAS, 1967; DESMONTS & COUVREUR, 1974c) ou em cultura de células (CHANG et al, 1972; DEROUIN, MAZERON & GARIN, 1987). De acordo com Abbas (1967), a inoculação feita em camundongos é mais sensível do que a realizada em cultura de células. Segundo Derouin, Mazon & Garin (1987), os processos de isolamento do parasita por inoculação de material contaminado em camundongos ou em cultura de células apresentam o mesmo grau de sensibilidade. Nos casos em que os parasitas são virulentos para o camundongo, as formas taquizoítas de *T.gondii* podem ser demonstradas no exsudato peritoneal do animal, 2 a 10 dias após a inoculação. Entretanto, nos casos em que os parasitas apresentam baixa virulência para o camundongo, o processo de isolamento pode ser lento, podendo demorar de 4 a 6 semanas (ABBAS, 1967; DEROUIN, MAZERON & GARIN, 1987; REMINGTON & DESMONTS, 1990).

Desmonts & Couvreur (1974c), inoculando em camundongos extratos de placenta de 123 mulheres que adquiriram toxoplasmose durante a gestação, conseguiram isolar o parasita em 30 (25%) casos. Desmonts, inoculando em camundongos amostras de sangue de 69 crianças com toxoplasmose congênita, conseguiu isolar o parasita em 30 (43%) casos. Em 20 (71%) casos onde o isolamento do parasita foi possível, a amostra de sangue da criança foi coletada durante a primeira semana de vida. (citado por REMINGTON & DESMONTS, 1990).

Os métodos de isolamento do *T.gondii* podem ser de grande utilidade para o diagnóstico da toxoplasmose, principalmente quando os resultados sorológicos são inconclusivos. Entretanto, tais métodos podem, somente, ser aplicados para o diagnóstico de rotina em laboratórios especializados. Além disto, convém ressaltar que, o isolamento do parasita a partir de extratos de tecidos pode refletir somente a presença de cistos nos tecidos, não sendo, portanto, prova definitiva da infecção aguda.

2. Demonstração da presença dos parasitas em tecidos ou fluídos do corpo.

A demonstração das formas taquizoítas do *T.gondii* em tecidos ou fluídos do corpo do hospedeiro confirma o diagnóstico de infecção aguda. Pelo fato dos cistos poderem se formar cedo, no curso da infecção, sua demonstração não afasta a possibilidade da infecção estar, ainda, na fase aguda (REMINGTON & DESMONTS, 1990).

A demonstração dos parasitas, utilizando métodos de coloração rotineiros é, frequentemente, muito difícil. Por esta razão, as técnicas de imunofluorescência têm sido, normalmente utilizadas. Frenkel & Piekarski (1978), com relação ao emprego de técnicas fluorescentes, ressaltaram a importância da utilização de controles adequados, entre os quais a reexaminação do material positivo com o conjugado fluorescente adsorvido com *T.gondii*. Esta necessidade dificulta o diagnóstico, quando se encontra poucos corpos fluorescentes nas lâminas examinadas.

3. Demonstração de antígenos no soro ou em outros fluidos do corpo.

van Knapen & Panggabean (1977) foram os primeiros pesquisadores que detectaram antígenos de *T.gondii* em soros de pacientes com toxoplasmose. Analisando 1162 soros de pacientes com suspeita clínica de toxoplasmose aguda, encaminhados a seu laboratório para confirmação sorológica, eles detectaram antígenos de *T.gondii*, através de uma técnica imunoenzimática (ELISA), em 64 (5,7%) soros. A antigenemia foi mais comumente demonstrada nos soros em que anticorpos IgM anti-*T.gondii* foram detectados por imunofluorescência indireta (IFI). Araujo & Remington (1980) detectaram, através de ELISA, antígenos de *T.gondii* em 15 (65%) de 23 soros de 22 pacientes com toxoplasmose aguda. Antígenos de *T. gondii* não foram detectados em soros de 28 pessoas normais com sorologia negativa para toxoplasmose nem em 55 soros de pessoas com infecção toxoplásmica crônica. Os autores, também, detectaram antígenos de *T.gondii* no líquido amniótico e no líquido cefalorraquiano de recém-nascidos com toxoplasmose congênita.

A detecção de antígenos de *T.gondii* é útil em casos onde os achados clínicos são sugestivos de toxoplasmose aguda mas os resultados dos testes sorológicos são inconclusivos. A detecção de antígenos é, particularmente, importante em pacientes com comprometimento da resposta imune e em pacientes submetidos à terapia imunossupressora.

Na maioria das técnicas imunoenzimáticas para a detecção de antígenos circulantes, os antígenos são capturados por anticorpos da classe IgG ou por fragmentos $F(ab')_2$ resultantes da digestão enzimática dos anticorpos IgG. Resultados falso-positivos, devido a presença de fatores reumatóides nos soros examinados, têm sido encontrados quando os orifícios das placas de ELISA são recobertos com moléculas de IgG (YOLKEN & STOPA, 1979; ARAUJO & REMINGTON, 1980). Os fatores anti-nucleares (FAN) presentes no soro podem, também, produzir resultados falso-positivos. (ARAUJO, HANDMAN & REMINGTON, 1980). Os FAN podem interagir com antígenos de *T.gondii* (ARAUJO et al, 1971) ou com os fragmentos $F(ab')_2$ e Fc da molécula de IgG (REKVIG & HANNESTAD, 1979; RUBIN & CARR, 1979; ARAUJO, HANDMAN & REMINGTON, 1980).

4. Demonstração de anticorpos no soro.

A pesquisa de anticorpos no soro tem sido muito utilizada para a confirmação da suspeita clínica da toxoplasmose. A detecção de anticorpos da classe IgM dirigidos contra antígenos de *T.gondii* e a elevação significativa dos títulos de anticorpos específicos, usualmente IgG anti-*T.gondii*, têm sido os parâmetros laboratoriais mais utilizados para o diagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida e da toxoplasmose congênita.

Entre os vários testes usados para o imunodiagnóstico da toxoplasmose salientam-se:

a - Reação de Sabin-Feldman (RSF)

A RSF, também conhecida por teste do corante, foi descrita por Sabin & Feldman em 1948. A reação consiste na incubação de formas taquizoítas vivas com diluições do soro do paciente, uma fonte de complemento e uma solução tamponada de azul de metileno. Na ausência de anticorpos específicos no soro do paciente, os parasitas incorporam o corante e se coram de azul. Se o paciente possuir anticorpos específicos, como consequência da desestruturação da parede celular dos parasitas pela ação do sistema complemento, os organismos não incorporam o corante (SABIN & FELDMAN, 1948; FELDMAN, 1980). A RSF não permite a distinção entre anticorpos específicos das classes IgM e IgG. Os títulos de anticorpos específicos obtidos com a RSF sobem rapidamente, atingindo, na maior parte dos pacientes, valores máximos durante os dois primeiros meses de infecção, de modo que a elevação significativa de títulos é dificilmente detectada (WELCH et al, 1980; BROOKS, McCABE & REMINGTON, 1987).

Brooks, McCabe & Remington (1987), analisando amostras sequenciais de soros de 53 pacientes com toxoplasmose aguda, detectaram elevação de títulos de RSF em 10 (19%) pacientes. Os autores, também, observaram que 93% dos pacientes estudados apresentavam, dentro dos primeiros seis meses após a infecção, títulos de RSF ≥ 1.024 .

Entretanto, no mesmo período de tempo, somente 77% dos pacientes apresentavam títulos de RSF ≥ 2.048 .

Títulos máximos de RSF variando de 1.024 a 64.000 têm sido observados (NAOT & REMINGTON, 1980; WELCH et al, 1980). Após atingirem valores máximos, os níveis de anticorpos, na maior parte dos pacientes, diminuem vagarosamente. Como consequência, em alguns pacientes, títulos altos podem persistir por um longo período de tempo (WELCH et al, 1980). Brooks, McCabe & Remington (1987), analisando amostras de soros de pacientes com toxoplasmose, obtidas depois de 1 ano do início das manifestações clínicas, detectaram títulos de RSF ≥ 1.024 em 62% dos casos.

Como já enfatizado, através da RSF, dificilmente é possível determinar a época em que ocorreu a infecção com *T.gondii*. Entretanto, dada a sua alta sensibilidade e especificidade, a RSF é, ainda hoje, o teste de referência para o imunodiagnóstico da toxoplasmose. Pelo fato da RSF necessitar de parasitas vivos, a reação raramente tem sido utilizada fora de centros de referência.

b - Reação de imunofluorescência indireta (IFI)

A IFI utiliza parasitas fixados às lâminas de microscopia. Diluições do soro do paciente são colocadas sobre as porções da lâmina contendo os parasitas e, após incubação e lavagem apropriadas, um conjugado composto de anticorpos anti-imunoglobulina humana (geralmente anti-IgM ou anti-IgG) marcados com fluoresceína é utilizado para visualizar as reações. Uma reação positiva é detectada pela cor amarelo-esverdeada dos parasitas quando examinados através de microscopia de fluorescência.

Walton, Benchoff & Brooks (1966), em um cuidadoso estudo qualitativo e quantitativo, comparando os resultados obtidos com a RSF e IFI encontraram uma concordância de 97.5% nos resultados qualitativos e de 96.4% nos resultados quantitativos (dentro de uma variação de 2 diluições). A excelente correlação com a RSF, a possibilidade

de detecção, isoladamente, de anticorpos específicos das classes IgM e IgG e o fato de não necessitar de parasitas vivos, fazem com que a IFI, desde a sua introdução, seja amplamente utilizada em laboratórios de rotina e de pesquisa.

Através da IFI, o diagnóstico da infecção toxoplásmica aguda pode ser feito pela pesquisa de anticorpos específicos da classe IgM ou pela elevação significativa dos títulos de anticorpos específicos, usualmente os da classe IgG. Os níveis de anticorpos IgM anti-*T.gondii*, detectados por IFI, aumentam rapidamente durante as primeiras semanas após a infecção (CAMARGO & LESER, 1976; WELCH et al, 1980). Camargo & Leser (1976), detectaram, através de IFI, anticorpos específicos da classe IgM em 134 (98,5%) de 136 amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda coletadas, no máximo, até 1 mês após o início das manifestações clínicas. Nas amostras positivas, os títulos de IFI variaram de 16 a > 16.384 . A análise de amostras sequenciais de soros dos pacientes revelou que em 2 casos as reações de IFI, ainda, permaneceram positivas 23 meses após as manifestações clínicas da infecção. Nos demais casos as reações negativaram num período variável de 1 a 18 meses após o início das manifestações clínicas sendo que em 50% dos casos a negatificação ocorreu dentro dos seis primeiros meses após a infecção. Títulos máximos de IgG por IFI foram alcançados, na maioria dos pacientes, nos dois primeiros meses após o início dos sinais e sintomas da infecção. Em alguns pacientes, os títulos máximos só foram alcançados 4 a 5 meses após o início das manifestações clínicas. Títulos superiores a 4.000 foram observados em 93,5% dos pacientes. Após atingirem valores máximos, os níveis de IgG caíram lentamente. Em 68,4% dos pacientes, títulos de IgG por IFI superiores a 4.000 foram observados em amostras de soros coletadas 2 anos após a infecção.

Welch et al (1980), em amostras sequenciais de soros de 27 pacientes com toxoplasmose aguda, encontraram títulos de IgM anti-*T.gondii*, por IFI, variando de 10 a 10.240. Em todos os pacientes, no fim do quinto mês após a infecção, os títulos de anticorpos IgM foram inferiores a 160, sugerindo aos autores que títulos de IFI ≥ 160 seriam bons indicadores de infecção aguda por *T.gondii*.

Anticorpos IgG anti-*T.gondii* presentes no soro podem inibir a demonstração de anticorpos específicos da classe IgM por IFI (NAOT & REMINGTON, 1980). Resultados falso-negativos referentes à pesquisa de IgM por IFI, também, têm sido observados quando a IFI é comparada com outras técnicas de maior sensibilidade (NAOT & REMINGTON, 1980; NAOT, DESMONTS & REMINGTON, 1981).

Resultados falso-positivos por IFI, particularmente na pesquisa de anticorpos IgM específicos, têm sido documentados em pessoas em cujos soros são encontrados fatores reumatóides (CAMARGO, LESER & ROCCA, 1972; HYDE, BARNETT & REMINGTON, 1975; CAMARGO et al, 1978) e/ou fatores anti-nucleares (ARAUJO et al, 1971). Entre os processos utilizados para a remoção de fatores reumatóides dos soros destacam-se o tratamento dos mesmos com IgG humana agregada pelo calor (CAMARGO, LESER & ROCCA, 1972; HYDE, BARNETT & REMINGTON, 1975) ou com partículas de látex revestidas com IgG humana (CHANTLER et al, 1976).

c - Reação de fixação de complemento (RFC)

A RFC consiste na incubação da preparação antigênica (Ag) com o soro do paciente (S) e soro de cobaia, como fonte de complemento (C). A presença ou ausência de anticorpos específicos no soro do paciente é detectada adicionando-se ao sistema Ag-S-C hemácias de carneiro sensibilizadas com anticorpos anti-hemácias (sistema indicador). Se no soro do paciente houver anticorpos específicos (Ac) para o antígeno, após a interação Ag-Ac, o sistema complemento é ativado e consumido, de modo que não é observada lise das hemácias. Por outro lado, na ausência de anticorpos específicos, após a adição do sistema indicador, é observada a lise das hemácias.

A RFC para a detecção de anticorpos anti-*T.gondii* foi descrita por Waren & Sabin, em 1942. A RFC para o imunodiagnóstico da toxoplasmose foi bastante utilizada até a descrição da RSF, em 1948 por Sabin & Feldman. A partir da década de 50, a RSF tornou-se amplamente utilizada devido a sua maior sensibilidade e especificidade.

Camargo e Leser (1976), analisando amostras sequenciais de soros de 136 pacientes com toxoplasmose recentemente adquirida, detectaram, na maioria dos pacientes, títulos máximos de RFC, já nas primeiras amostras testadas, obtidas durante os 2 primeiros meses após a evidência clínica da infecção. Os autores observaram títulos de RFC variando de 40 a > 640. Títulos altos (>80) foram detectados por muitos meses após a infecção. Após 2 anos do início da infecção, 70% dos pacientes apresentavam, ainda, títulos de RFC > 80. Welch et al (1980), analisando amostras seriadas de soros de 27 pacientes com toxoplasmose aguda, observaram que os níveis de anticorpos detectados por RFC subiram lentamente atingindo valores máximos, geralmente, 3 a 10 meses após o princípio das manifestações clínicas. Os autores observaram títulos de RFC variando de 4 a 512. Os títulos da RFC permaneceram, na maioria dos pacientes, elevados (> 4) por meses e em alguns pacientes por anos. Dois pacientes, após 2 anos do início das manifestações clínicas, apresentavam, ainda, títulos de RFC de 64. Elevação significativa do título de anticorpos por RFC foi observada em 58% dos pacientes. Segundo os autores, a elevação do título de anticorpos específicos por RFC pode contribuir para o diagnóstico da toxoplasmose aguda quando os níveis de anticorpos detectados pela RSF estão elevados e estáveis.

Diferenças significativas em termos de resultados obtidos com a RFC para toxoplasmose, têm sido registradas em várias publicações. Estas diferenças devem-se, em grande parte, à utilização, por diferentes grupos de pesquisa, de diferentes preparações antigênicas.

d -Reação de hemaglutinação indireta (HI)

Na HI, hemácias revestidas com antígenos são aglutinadas na presença de soros contendo anticorpos específicos dirigidos contra o antígeno usado no revestimento.

Jacobs & Lunde (1957) foram os primeiros pesquisadores que utilizaram a HI para a pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii*. Estes autores encontraram uma correlação aceitável entre a HI e a RSF.

A cinética de detecção dos anticorpos anti-*T.gondii* por HI depende da preparação antigênica usada para o revestimento das hemácias. Quando o revestimento é feito com antígenos citoplasmáticos, os anticorpos detectados por HI aparecem mais tardiamente do que os detectados por IFI, e os títulos da reação após permanecerem baixos por algumas semanas, sobem vagarosamente no curso da infecção. Em 80% dos casos, a equivalência em título entre as reações de HI e IFI para a detecção de IgG, ocorre entre 1 a 12 meses após as manifestações clínicas, sendo mais frequente entre o 5º e 8º mês (CAMARGO & LESER, 1976). No caso do revestimento ser feito com antígenos citoplasmáticos e de membrana, os anticorpos detectados por HI aparecem tão cedo quanto os detectados por IFI e os títulos de HI sobem rapidamente atingindo valores máximos 2 a 3 meses após o início das manifestações clínicas, (SENET, ROBERT & MAURAS, 1976; AMBROISE-THOMAS, SIMON & BAYARD, 1978).

Os títulos de HI tendem, na grande maioria das pessoas, a permanecer elevados (> 4.000) por mais de 2 anos após a infecção com *T.gondii* (CAMARGO, LESER & ROCCA, 1972; CAMARGO & LESER, 1976).

Em situações onde os títulos de RSF e IFI para detecção de IgG já estejam elevados e estabilizados, a elevação significativa dos títulos de HI pode ter grande utilidade para o diagnóstico da infecção aguda adquirida. A utilização da HI para o diagnóstico da toxoplasmose congênita não é recomendada. Casos de toxoplasmose congênita com HI negativa e RSF positiva, têm sido encontrados com grande frequência (BEN RACHID, FERRERO & DESMONTS, 1967; REMINGTON & DESMONTS, 1990).

e - Aglutinação direta - (AD)

Na AD, parasitas tratados com formalina são aglutinados na presença de soros contendo anticorpos específicos. A AD para toxoplasmose, usando formas taquizoítas do *T.gondii* formolizadas, foi descrita por Fulton & Turk, em 1959. A partir de 1967, com a descrição de uma técnica capaz de produzir grandes quantidades de formas taquizoítas (ARDOIN, 1967), a AD passou a ser muito utilizada para o diagnóstico da toxoplasmose.

Entretanto, somente as modificações efetuadas por Desmonts & Remington, em 1980, fizeram com que o teste adquirisse sensibilidade e especificidade aceitáveis. As modificações principais foram referentes ao modo de obtenção das formas taquizoítas e ao prévio tratamento dos soros com 2-mercaptoetanol (2-ME) para a eliminação de anticorpos naturais da classe IgM que ocasionavam reações falso-positivas (DESMONTS & REMINGTON, 1980).

A AD começa a detectar anticorpos anti-*T.gondii* alguns dias depois da RSF. Os níveis de anticorpos detectados por AD se elevam vagarosamente e, na maior parte dos pacientes, continuam a subir na época em que os títulos de RSF já estão estabilizados. Em relação aos títulos da RSF, os títulos de AD são, frequentemente, menores durante as primeiras semanas de infecção, levemente superiores à medida que a infecção progride e, em muitos casos, muito superiores em infecções crônicas (DESMONTS & REMINGTON, 1980).

Brooks, McCabe & Remington, em 1987, apresentaram os resultados obtidos por AD em amostras de soros de 78 pacientes com toxoplasmose aguda coletadas, no máximo, até 6 meses após o início das manifestações clínicas da infecção. Títulos ≥ 2.048 foram observados em 59 (76%) pacientes. Analisando amostras sequenciais de soros de 42 destes pacientes, os autores detectaram elevação significativa dos títulos de AD em 17 (40%) casos. Em 13 pacientes a elevação do título foi observada 2 a 5 meses após o início das manifestações clínicas e em 4 pacientes entre 6 a 12 meses.

Cumpramos ressaltar que, devido ao prévio tratamento dos soros com 2-ME, a AD para toxoplasmose não é capaz de detectar anticorpos IgM anti-*T.gondii*.

f - Reações imunoenzimáticas (ELISA)

As reações imunoenzimáticas são realizadas, geralmente, em placas de poliestireno. Embora exista uma grande variação destas técnicas, salientamos as reações imunoenzimáticas direta (ELISAd) e de captura (ELISAc), por terem sido utilizadas em

nosso trabalho. Na reação direta, os soros dos pacientes são adicionados aos orifícios das placas de poliestireno revestidos com a preparação antigênica. Após o período de incubação da reação e lavagem dos orifícios, um conjugado, anti-imunoglobulina humana marcada com uma enzima, é adicionado aos orifícios (em algumas reações uma anti-imunoglobulina produzida em uma espécie animal é usada para o reconhecimento dos anticorpos humanos, sendo reconhecida, numa etapa seguinte, por uma outra anti-imunoglobulina, produzida em um animal de espécie diferente, marcada com uma enzima). Após o período de incubação da reação e lavagem dos orifícios, o substrato da enzima é adicionado ao sistema para a visualização das reações. Na técnica imunoenzimática de captura, os orifícios das placas de poliestireno são revestidos com anti-imunoglobulina humana (anti-IgM, anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgE). Quando o soro do paciente é adicionado aos orifícios, ocorre a interação entre a anti-imunoglobulina usada no revestimento da placa com a classe de imunoglobulina correspondente presente no soro. Após o período de incubação da reação e lavagem dos orifícios, uma solução composta de antígeno (no caso, antígeno de *T.gondii*) e anticorpos dirigidos contra o antígeno marcados com uma enzima, é adicionada à placa (em algumas técnicas, a adição do antígeno e dos anticorpos marcados com a enzima são realizadas em etapas distintas). Após o período de incubação da reação e lavagem dos orifícios, o substrato da enzima é adicionado ao sistema para a visualização das reações.

A reação de ELISA para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose foi descrita por Voller et al (1976). Analisando soros de pacientes com suspeita clínica de toxoplasmose, os autores encontraram uma correlação positiva entre os resultados obtidos com os testes de ELISAd, RSF e HI.

Camargo et al (1978) avaliaram a eficácia de técnicas imunoenzimáticas diretas para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*T.gondii* na toxoplasmose humana. Amostras de soros de 36 pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda, confirmada pela detecção de IgM por IFI, foram testadas por ELISA. O teste de ELISA detectou anticorpos específicos da classe IgM em todas as amostras de soros analisadas. Os títulos obtidos com os testes de ELISA e IFI foram significativamente diferentes. A média geométrica dos títulos obtidos por ELISA foi mais de 5 vezes superior à obtida com os títulos de IFI. Com relação aos anticorpos IgG, houve uma excelente concordância entre os títulos obtidos por ELISA e

IFI. Títulos iguais ou variando em apenas uma diluição, foram observados em 94,4% dos soros, e nenhuma diferença significativa foi observada nas médias geométricas dos títulos das duas reações. Entretanto, os títulos de IgG por IFI e ELISA foram significativamente maiores do que aqueles obtidos por HI. Os autores, também, observaram através de ELISA e IFI reações falso-positivas com relação à pesquisa de anticorpos IgM.

A técnica de ELISAc para a detecção de anticorpos específicos IgM anti-*T.gondii* foi descrita por Naot & Remington, em 1980. Através de um estudo comparativo, os autores mostraram que a técnica de ELISAc apresentava sensibilidade e especificidade superiores a IFI. Em 29 amostras de soros de pacientes apresentando história clínica compatível com toxoplasmose aguda, anticorpos específicos da classe IgM foram detectados por ELISAc e IFI em, respectivamente, 28 (96,5%) e 17 (58,5%) soros. Nas amostras de soros positivas pelas duas técnicas, os títulos de ELISAc foram, pelo menos, 6 vezes maiores do que aqueles obtidos com IFI. Na amostra de soro negativa por ELISAc, anticorpos IgM, também, não foram detectados por IFI. Esta amostra de soro, apresentando RSF com título de 8.000, foi coletada, 3 meses após o início das manifestações clínicas, de um paciente com biopsia de linfonodo com características histológicas compatíveis com toxoplasmose aguda. A técnica de ELISAc foi negativa em 38 amostras de soros de pessoas com toxoplasmose crônica e em 9 amostras de soros de pessoas saudáveis. A técnica de ELISAc, também, foi negativa em soros contendo FR e FAN, obtidos de pacientes sem evidência clínica de toxoplasmose aguda, apresentando IFI positiva para IgM. Brooks, McCabe & Remington, em 1987, apresentaram resultados da pesquisa de anticorpos IgM, por ELISAc e IFI, obtidos pela revisão dos registros médicos de 92 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica diagnosticada por biopsia de linfonodos. Nos seis primeiros meses após a linfadenopatia, os anticorpos IgM foram demonstrados por ELISA e IFI em, respectivamente, 88% e 78% dos casos. No intervalo de tempo de 7 a 12 meses após o princípio da linfadenopatia, as reações de ELISA e IFI foram positivas em, respectivamente, 50% e 22% dos pacientes. Aproximadamente 20% dos pacientes que tinham amostras de soros coletadas mais de 12 meses após a linfadenopatia apresentavam, ainda, reações de ELISA positivas.

g - Imunocaptura-aglutinação (IC-A)

No teste de IC-A, orifícios de placas de poliestireno são revestidos com anti-imunoglobulina humana (anti-IgM, anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgE). Quando o soro do paciente é adicionado aos orifícios, ocorre a interação entre a anti-imunoglobulina usada no revestimento da placa com a classe de imunoglobulina correspondente que está presente no soro do paciente. Após o período de incubação da reação, os orifícios são lavados para remoção de materiais adsorvidos não especificamente e aos mesmos é adicionado uma suspensão de parasitas tratados com formalina (no caso, formas taquizoítas de *T.gondii*). Após o período de incubação, visualiza-se as reações positivas pelo padrão de sedimentação dos parasitas similar àquele observado nas reações de aglutinação.

O teste de IC-A para a detecção de anticorpos IgM anti-*T.gondii* foi descrito por Desmonts, Naot & Remington, em 1981. No trabalho pioneiro, amostras de soros de 50 pacientes com toxoplasmose aguda, 25 com anticorpos IgM detectados por IFI e 25 com IFI negativa para IgM, foram analisadas por ELISAc e IC-A. Nas amostras de soros com reações de IFI negativas, os testes de ELISAc e IC-A detectaram anticorpos IgM específicos em, respectivamente, 25 (100%) e 16 (64%) pacientes. Nas amostras de soros com reações de IFI positivas, os testes de ELISAc e IC-A foram positivos em todos os pacientes. O teste de IC-A foi negativo em 25 indivíduos com sorologia negativa para toxoplasmose através de RSF, IFI e ELISAc e em 25 indivíduos com toxoplasmose crônica. Os testes de IC-A e ELISAc, também, foram negativos em amostras de soros contendo FR e/ou FAN.

Pesquisa de anticorpos IgA anti-*T.gondii* para o diagnóstico da toxoplasmose adquirida e congênita

A elevada prevalência nas populações de indivíduos com anticorpos IgG anti-*T.gondii*, muitos deles com altos títulos de anticorpos específicos, e o fato dos anticorpos específicos da classe IgM poderem persistir, em algumas pessoas por meses, ou mesmo

anos, após a infecção com *T.gondii*, têm dificultado a interpretação dos resultados sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose aguda.

A utilidade da pesquisa de anticorpos IgA anti-*T.gondii* para o diagnóstico da fase aguda da toxoplasmose adquirida e da toxoplasmose congênita tem sido avaliada, nos últimos anos, por vários autores, utilizando várias técnicas imunológicas.

Turunen, Vuorio & Leinikki (1983), pesquisaram, através de técnicas imunoenzimáticas diretas, anticorpos anti-*T.gondii* das classes IgM e IgA em amostras sequenciais de soros de 14 pacientes com suspeita clínica de toxoplasmose aguda. Na maioria dos pacientes, os níveis máximos de IgM foram alcançados dentro do primeiro mês após as manifestações clínicas. Os níveis máximos de IgA, na maioria dos pacientes, foram alcançados 2 a 3 meses após o início das manifestações clínicas. Os autores observaram que, no decorrer da infecção, os níveis de anticorpos IgA diminuíam mais vagarosamente do que os níveis de anticorpos IgM. Alguns pacientes, depois de 1 a 2 meses do início das manifestações clínicas apresentavam pesquisa de IgM negativa e IgA positiva. Depois de 6 meses do início das manifestações clínicas, alguns pacientes, ainda, apresentavam pesquisa de IgM e/ou IgA positiva, e, depois de 12 meses, somente casos apresentando IgA positiva e IgM negativa foram observados. Partanen et al (1984), utilizando amostras sequenciais de soros de um caso de infecção toxoplásmica acidental ocorrido em laboratório, identificaram, através de "immunoblotting", antígenos de *T.gondii* capazes de induzir anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA. Os anticorpos IgG reagiram com múltiplos componentes de *T.gondii*, com pesos moleculares variando de 6.000 a 150.000 Daltons (D). Os anticorpos das classes IgM e IgA reconheceram um número mais restrito de componentes do parasita. Polipeptídeos de 14, 25, 30, 35, 40 e 50 kD e polipeptídeos de 25, 30, 32, 35, 40 e 50 kD foram reconhecidos, respectivamente, por anticorpos IgM e IgA presentes nas amostras de soros obtidas na fase aguda da infecção. Os anticorpos das classes IgG, IgM e IgA, também, foram pesquisados, através de técnicas imunoenzimáticas diretas, em amostras de soros coletadas 4, 6, 9 e 45 semanas após a infecção. Os anticorpos das três classes foram detectados nas amostras de soros coletadas 4, 6 e 9 semanas após a infecção. Na amostra coletada com 45 semanas, foram detectados somente anticorpos das classes IgG e IgA. Le Fichoux, Marty & Chan (1987), pesquisaram anticorpos IgM e IgA anti-*T.gondii*,

através da técnica de IC-A, em amostras sequenciais de soros de 11 pacientes com toxoplasmose aguda. Em 10 pacientes, os autores observaram negatificação da pesquisa de IgA com pesquisa de IgM ainda positiva. De um modo geral, os anticorpos IgM foram detectados, no máximo, até 140 dias após o desaparecimento dos anticorpos IgA. Decoster et al (1988), pesquisaram, através de ELISAc, anticorpos das classes IgA e IgM dirigidos contra uma proteína de superfície de *T.gondii* com peso molecular de 30.000 daltons (P30), em 89 amostras de soros de 56 pacientes com toxoplasmose aguda, coletadas até 8 meses após a infecção, e em amostras de sangue de cordão de 8 crianças com toxoplasmose congênita. Anticorpos IgA e IgM anti-P30 foram detectados, respectivamente, em 89 (100%) e 77 (87%) das amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda. Das 12 amostras de soros com IgM negativa, 2 foram coletadas de 2 pacientes logo após o início das manifestações clínicas e 10 foram coletadas entre 6 a 8 meses após a infecção. Com relação à pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii* em sangue de cordão, anticorpos IgA e IgM anti-P30 foram detectados, respectivamente, em 8 (100%) e 3 (38%) amostras testadas. As amostras de sangue de cordão com pesquisa de IgM anti-P30 negativa pertenciam a crianças cujas mães foram infectadas no começo da gestação. Pujol, Morel & Malbruny (1989) pesquisaram, através de IC-A, anticorpos específicos da classe IgA em amostras de soros coletadas, no máximo, até 6 meses após a infecção com *T.gondii*. Os anticorpos da classe IgA foram detectados em, aproximadamente, 93%, 90% e 9% das amostras coletadas, respectivamente, 1,3 e 6 meses após a infecção toxoplásmica. Stepick-Biek et al (1990) pesquisaram, através de IC-A, anticorpos IgM e IgA anti-*T.gondii* nos seguintes grupos de pacientes: a) 12 gestantes que apresentaram soro-conversão, detectada por RSF, durante a gravidez; b) 10 pacientes apresentando linfadenopatia toxoplásmica e sorologia compatível com a fase aguda da infecção; c) 2 fetos e 7 recém-nascidos com toxoplasmose congênita diagnosticada pelo isolamento do parasita a partir do fluido amniótico e/ou sangue. Anticorpos das classes IgM e IgA foram detectados em todas as gestantes e em todos os pacientes com linfadenopatia toxoplásmica. Anticorpos da classe IgA foram detectados em amostras de sangue dos dois fetos coletadas, aproximadamente, 3 1/2 meses antes da época prevista para o nascimento e em amostras de sangue coletadas logo após o nascimento. Anticorpos da classe IgM não foram detectados nas amostras de sangue fetal nem nas amostras coletadas dos recém-nascidos. Com relação aos 7 recém-nascidos com infecção

congênita, em 5 casos foram detectados anticorpos das classes IgM e IgA e em 2 casos somente anticorpos da classe IgA. A utilidade da pesquisa de anticorpos IgA anti-*T.gondii* para o diagnóstico da toxoplasmose congênita foi confirmada por Decoster et al, em 1991. Os autores pesquisaram, através de ELISAc, anticorpos IgM e IgA anti-P30 em amostras sequenciais de soros de 23 crianças com toxoplasmose congênita. Os anticorpos da classe IgA foram detectados nos 23 casos. A IgA anti-P30 foi detectada durante a vida intrauterina, mas não ao nascimento, em 1 criança, ao nascimento em 16 crianças e nas semanas seguintes ao nascimento nas outras 6 crianças. Anticorpos IgM anti-P30 foram detectados ao nascimento em 10 crianças e nas semanas subsequentes ao nascimento em outras 3 crianças. Bessières et al (1992) detectaram, através do teste de IC-A, anticorpos específicos da classe IgA em 247 (95%) de 260 pacientes com toxoplasmose aguda adquirida. Os autores, também, pesquisaram, através do teste de IC-A, anticorpos IgM e IgA anti-*T.gondii* em amostras sequenciais de soros de mulheres grávidas com soro-conversão durante a gestação detectada através de RSF. Os anticorpos IgM foram detectados 7 a 15 dias após a infecção e atingiram níveis máximos nos 2 meses subsequentes. Os anticorpos IgA foram detectados ao fim do primeiro mês de infecção e atingiram níveis máximos entre 2 a 3 meses após a contaminação. Os anticorpos IgA desapareceram antes dos anticorpos IgM, geralmente, antes de 6 meses após a infecção. Em 48 amostras de soros coletadas entre 6 a 24 meses após a infecção, os autores detectaram anticorpos IgM em todas as amostras e IgA em somente 2 amostras. Anticorpos anti-*T.gondii* das classes IgM e IgA, também, foram pesquisados em 28 amostras de sangue de cordão de crianças com toxoplasmose congênita. Os anticorpos das classes IgA e IgM foram detectados em, respectivamente, 21 (75%) e 17 (61%) amostras. Patel et al (1993) pesquisaram, através de ELISAc, anticorpos IgA anti-*T.gondii* em 2 baterias de soros. A primeira bateria era composta por 359 soros, todos apresentando RSF positiva e reações de ELISAc e IC-A negativas para IgM anti-*T.gondii*. A segunda bateria era composta por 148 soros, todos apresentando RSF positiva e ELISAc e IC-A com níveis significativos de anticorpos IgM anti-*T.gondii*. Anticorpos IgA anti-*T.gondii* foram detectados, através de ELISAc, em 5 (1,4%) soros da primeira bateria e em 96 soros (64.9%) da segunda bateria.



2. Objetivos

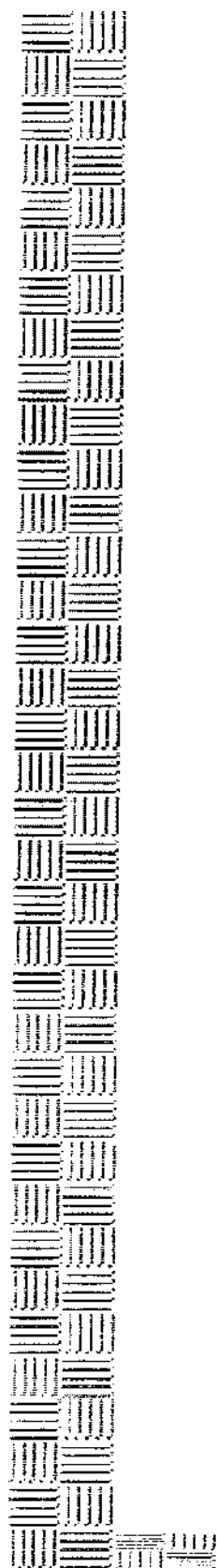
A revisão da literatura especializada mostrou que existem, ainda, controvérsias em relação a utilidade da pesquisa de anticorpos IgA anti-*T. gondii* para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda adquirida. Vários trabalhos têm mostrado que os anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgA são detectados com elevada frequência na fase aguda de toxoplasmose adquirida e, além disto, parecem não persistir, após a infecção com o parasita, por tempo tão longo quanto os anticorpos da classe IgM. Por outro lado, alguns pesquisadores têm enfatizado que os anticorpos IgM anti-*T. gondii* são detectados com uma frequência significativamente maior do que os anticorpos específicos da classe IgA na fase aguda da toxoplasmose e que os mesmos tendem a desaparecer antes dos anticorpos específicos da classe IgA no curso da infecção toxoplásmica.

A análise da bibliografia pertinente mostrou que a grande maioria dos dados relativos à pesquisa de IgA anti-*T. gondii* na toxoplasmose humana foram obtidos com as técnicas de ELISAd, ELISAc e IC-A. Em vários estudos, as conclusões referentes a utilidade da pesquisa dos anticorpos IgA para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda adquirida foram baseadas, somente, no estudo das sensibilidades e especificidades das técnicas empregadas. Em muitos casos, técnicas qualitativas foram utilizadas ou os dados obtidos com técnicas quantitativas e/ou semi-quantitativas foram expressos de modo qualitativo, dificultando a interpretação dos resultados. Além disto, em muitos estudos, devido a dificuldade do diagnóstico clínico da toxoplasmose, as amostras de soros dos pacientes com toxoplasmose aguda utilizadas foram selecionadas, somente, por critérios sorológicos.

O presente estudo foi delineado para avaliar a utilidade da pesquisa dos anticorpos IgA anti-*T. gondii* para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda adquirida.

Os objetivos do nosso trabalho foram:

- Desenvolver uma técnica de ELISAd quantitativa para a pesquisa de anticorpos IgA anti-*T.gondii*.
- Determinar as sensibilidades e especificidades das técnicas de ELISAd, ELISAc e IC-A, com relação à pesquisa de IgA anti *T. gondii*, para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda adquirida.
- Avaliar, através de um estudo comparativo, a persistência dos anticorpos específicos da classe IgA, detectados por ELISAd, ELISAc e IC-A, e dos anticorpos da classe IgM, detectados por IFI, ELISAc e por uma técnica de quimioluminescência baseada em princípios imunoenzimáticos (QmL), após a infecção com *T. gondii*.



3. Material, Métodos e Casuística

Material e Métodos

1. Reagentes usados

Acetato de sódio, ácido acético glacial, ácido bórico, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, azida sódica, azul de Evans, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, etanol, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, glicerina, glicina, hidróxido de sódio, Ponceau S, reagente de fenol segundo Folin-Ciocalteu, sulfato de cobre, tartarato de sódio, tetraborato de sódio (E. Merck, Darmstadt, Germany); agarose L, soro de carneiro anti-IgG humana, soro de coelho anti-IgA humana, (Behringwerke AG, Marburg, Germany); antígeno toxoplásmico para imunofluorescência indireta, anti-IgG humana marcada com fluoresceína, anti-IgM humana marcada com fluoresceína (Biolab-Merieux, France); albumina sérica bovina, anti-IgA humana marcada com peroxidase, formaldeído, sepharose 4B-proteína G (fluxo rápido), tetrametilbenzidina, tween 20, tris-(hidroximetil)-aminometano (Sigma Chemical Company, Saint Louis, USA); IgG monoclonal de camundongo anti-IgA humana (Biosoft, Compiègne, France); peróxido de hidrogênio (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA).

2. Reação de imunofluorescência indireta (IFI) para a pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii*

As reações de IFI foram realizadas de acordo com a técnica descrita por Camargo (1964), com algumas modificações. Em círculos delimitados em lâminas de microscopia contendo formas taquizoítas de *T.gondii* fixadas, foram aplicados 10 ul de várias diluições de cada soro, em solução salina tamponada com fosfatos 0.15M, pH 7.2 (SST). Na pesquisa de anticorpos da classe IgM, os soros foram previamente tratados com uma solução contendo anticorpos de carneiro anti-IgG humana. Após incubação, por 30 minutos, em câmara úmida, a 37°C, as lâminas foram lavadas 3 vezes, através de imersão em cubas de vidro contendo SST, durante 10 minutos por lavagem. Após secagem das lâminas, foram aplicados, à cada diluição do soro, 10 ul de anti-imunoglobulina humana (anti-IgG ou anti-IgM) marcada com fluoresceína, previamente titulada e diluída em SST

contendo 0.001% de azul de Evans. As lâminas foram deixadas em câmara úmida, a 37°C, durante 30 minutos, e a seguir lavadas e secas, como já descrito. As lâminas foram montadas, com o auxílio de glicerina tamponada, e observadas ao microscópio de fluorescência (microscópio Olympus CBA, Japão). O título da reação foi determinado como sendo o inverso da maior diluição do soro capaz de produzir uma reação fluorescente nitida.

3. ELISA de captura (ELISAc) para a pesquisa de anticorpos IgM anti-*T.gondii*

A pesquisa de IgM anti-*T. gondii* por ELISAc foi realizada utilizando-se kits comerciais ETI TOXOK-M (Sorin Biomédica, Itália). Resumidamente, aos orifícios de placas de poliestireno revestidos com anticorpos IgG de coelho anti-IgM humana, foram adicionados 100 ul das amostras de soros diluídas a 1:101. Após incubação das placas, por 1 hora, a 37°C, e lavagem dos orifícios com SST-Tween 20 (SST-Tw), 100 ul de uma solução contendo antígeno toxoplásmico e IgG monoclonal de camundongo anti-*T. gondii* marcada com peroxidase, foram adicionados aos orifícios. Após incubação das placas, por 1 hora, a 37°C, os orifícios foram lavados com SST-Tw, e aos mesmos foram adicionados 100 ul do sistema substrato, composto por tetrametilbenzidina-peróxido de hidrogênio (TMB-H₂O₂). As placas foram incubadas, por 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro, e as reações foram bloqueadas adicionando-se aos orifícios 200 ul de H₂SO₄ 1N. As absorbâncias das reações foram lidas a 450, 630 nm, em uma leitora de placas de ELISA (Eti-System Reader, Sorin Biomédica, Itália), utilizando um programa de computação apropriado (Eti-System Software). Um soro controle, para determinação do valor do cut-off, foi incluído em todos os ensaios. De acordo com as instruções do kit, amostras de soros apresentando absorbâncias iguais ou maiores do que as obtidas com o referido soro controle, foram consideradas positivas.

4. Reação de quimioluminescência (QmL) para a pesquisa de anticorpos IgM anti-*T. gondii*

A pesquisa de IgM anti-*T. gondii* por QmL foi realizada utilizando-se kits comerciais ACCESS^R Toxo M (Sanofi Diagnostics Pasteur, France). Um sistema automatizado para análises imunoenzimáticas (ACESSES^R Immunoassay System) foi utilizado para o processamento das amostras de soros testadas. Neste sistema, em tubos de reação apropriados, é feita a mistura da amostra de soro com uma suspensão de partículas paramagnéticas recobertas com anticorpos de cabra anti-IgM humana e antígeno de membrana de *T. gondii* marcado com fosfatase alcalina. Após o período de incubação, as partículas são separadas em um campo magnético e lavadas para remoção do material não ligado a fase sólida. Após a lavagem das partículas, um substrato quimioluminescente é adicionado ao sistema e a luz gerada pela reação é medida com um luminômetro. O nível de anticorpos IgM na amostra de soro é determinado automaticamente através de uma curva de calibração, previamente estocada no aparelho, composta por padrões com atividades de anticorpos conhecidas. De acordo com as instruções do kit, as amostras de soros com valores inferiores a 100 unidades arbitrárias por ml de soro (UA/ml) são consideradas negativas, amostras de soros com valores variando de 100 a 139 UA/ml apresentam resultados inconclusivos e amostras de soros com valores iguais ou superiores a 140 UA/ml são consideradas positivas.

5. ELISA direto (ELISAd) para a pesquisa de anticorpos IgA anti-*T. gondii*

*5.1. Obtenção da preparação antigênica de *T. gondii**

Camundongos Swiss foram infectados, por via intraperitoneal, com a cêpa N de *T. gondii*. Após 48 h, com o auxílio de seringa e agulha estéreis, foram inoculados 3 ml de SST estéril na cavidade peritoneal de cada camundongo infectado e o exsudato, contendo formas taquizoítas do parasita, foi aspirado e transferido para tubos de ensaio. Os parasitas foram lavados 4 vezes com SST estéril, por 15 minutos, a 2300 rpm, a 4°C, sendo o precipitado da última centrifugação ressuscitado em 2 ml de SST estéril. A suspensão de

parasitas foi submetida a sonicação (Sonicador Branson, modelo SX-B30), em banho de gelo, por 3 minutos (1 minuto de sonicação/1 minuto de pausa), com tempo de pulso de 20 segundos e potência 3. Após a sonicação, o material foi deixado por 16 horas, a 4°C, sob agitação contínua, a baixa velocidade e, a seguir, centrifugado a 18.000 x g, a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante (extrato bruto de *T. gondii*) foi separado, aliquotado e estocado a -80°C até o momento do uso.

5.2. Determinação das concentrações ótimas de antígeno, conjugado e substrato.

5.2.1. Obtenção da IgA humana

A IgA humana foi obtida, a partir de soros de pacientes com mieloma múltiplo de IgA, por cromatografia de afinidade, usando IgG de coelho anti-IgA humana (Behringwerke AG, Marburg, Germany) acoplada a Sepharose 4B como adsorvente, de acordo com a metodologia descrita por Garvey, Cremer & Sussdorf (1977). A Sepharose 4B ativada foi preparada reconstituindo-se 1 g da mesma em 50 ml de HCl 0.001M. O gel foi deixado, por 15 minutos, à temperatura ambiente, com agitação ocasional, sendo a seguir transferido para uma coluna de vidro (4x8cm) onde foi lavado com 200 ml de HCl 0.001M e com 200 ml de tampão carbonato-bicarbonato 0.1M, pH=8.9, contendo 0.5 M de NaCl. Após a lavagem, o gel foi transferido para um recipiente contendo 40 mg de IgG de coelho anti-IgA humana dissolvida em 10 ml de tampão carbonato-bicarbonato 0.1 M, pH=8.9, contendo 0.5M de NaCl. A mistura foi deixada, à temperatura ambiente, sob agitação ocasional, durante 2 horas, e, em seguida, transferida para um recipiente contendo 10 ml de tampão Tris-HCl 0.1M, pH = 8.1. O material foi deixado, 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação ocasional, sendo, então, transferido, novamente, para a coluna de vidro de 4x8 cm. O gel foi lavado, sucessivamente, com 150 ml de cada uma das seguintes soluções, contendo NaCl 0.5M : tampão carbonato-bicarbonato 0.1M, pH = 8.9, tampão acetato-ácido acético 0.1M, pH = 4.0 e tampão carbonato-bicarbonato 0.1M,

pH = 8.9. A seguir, o gel foi lavado com 150 ml de solução salina tamponada com borato 0.15M, pH = 8.4 (STB), sendo o fluxo da coluna interrompido quando o tampão cobria superficialmente o gel. Foram, então, adicionados 10 ml de uma solução de glicina-HCl 0.2M, pH = 2.5, que foram deixados em contato com o gel, com agitação ocasional, durante 15 minutos. O gel foi, então, lavado com 120 ml de STB e o fluxo da coluna interrompido, como já descrito. Um "pool" de soros de pacientes com mieloma múltiplo de IgA foi equilibrado com STB e 2 ml do material foram aplicados à coluna. O material foi deixado em contato com o gel, com agitação ocasional, durante 20 minutos. A seguir, o gel foi lavado com 180 ml de STB, para remover o material adsorvido não especificamente. Após a lavagem com STB, o fluxo da coluna foi interrompido, como já descrito, e 2.5 ml de uma solução de glicina-HCl 0.2M, pH = 2.5 foram adicionados à coluna. Com o fluxo da coluna fechado, o gel foi agitado, a cada 3 minutos, durante 15 minutos. O fluxo da coluna foi, então, normalizado e o efluente, contendo IgA humana, coletado. Ao mesmo tempo que o material era coletado, foram adicionados à coluna mais 2.5 ml da solução glicina-HCl, seguida de 15 ml de STB, de modo a se obter um efluente com volume final de aproximadamente 20 ml. O efluente foi dializado, durante 48 horas, a 4°C, contra STB, e concentrado por ultrafiltração, sob vácuo, através de membranas capazes de reter moléculas de pesos moleculares maiores do que 10.000 daltons (filtros imersíveis CX 10, Millipore Corp. Massachusetts, USA) Após determinação da concentração proteica, o material foi submetido à imunoelektroforese para avaliar a sua pureza. A concentração de IgA foi determinada através de imunodifusão radial.

5.2.2. Avaliação da pureza da preparação de IgA por Imunoelektroforese

Lâminas de vidro (26x76 mm) foram recobertas com 3ml de agarose a 1% em tampão barbital 0.05M pH=8.2. Esse mesmo tampão foi utilizado na eletroforese, que foi realizada com uma corrente contínua de 150 volts, durante aproximadamente 45 minutos (Fonte Boskamp-Pherostat, Germany). Após a aplicação do antissoro específico, as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida, a 4°C, durante 48 horas. Findo este intervalo de

tempo, as lâminas foram colocadas em placas de Petri contendo NaCl 0.15M, onde permaneceram por 48 horas, a 4°C, com várias trocas da solução salina. As lâminas foram, então, recobertas com papel de filtro saturado com água destilada e acondicionadas em estufa, a 37°C, durante 24 horas. Findo esse intervalo de tempo, o papel de filtro foi removido e as lâminas foram coradas com Ponceau S.

5.2.3. Titulação do conjugado

Aos orifícios de placas de poliestireno de fundo plano (Corning, New York, USA), foram adicionados 200 µl de uma solução contendo 3 µg/ml de IgA em tampão carbonato-bicarbonato 0.1M, pH = 9.6. Após incubação das placas, por 1 hora, à temperatura ambiente e, por 16 horas, a 4°C, os orifícios foram lavados 3 vezes com SST-Tw e aos mesmos foram adicionados 200 µl de várias diluições (1/500; 1/750; 1/1000, 1/3000 e 1/6000) do conjugado (soro de cabra contendo anticorpos anti-IgA humana marcados com peroxidase) em SST-Tw. Após incubação das placas, por 1 hora, à temperatura ambiente, os orifícios foram lavados, como já descrito, e aos mesmos foram adicionados 200 µl do sistema substrato (TMB/H₂O₂). Após incubação das placas, por 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro, as reações foram bloqueadas adicionando-se aos orifícios 50 µl de H₂SO₄ 4N. As absorbâncias das reações foram lidas, a 450 nm, em uma leitora de placas de ELISA (Eti-System Reader, Sorin Biomedica).

5.2.4. Determinação da concentração ótima do antígeno

Orifícios de placas de poliestireno de fundo plano (Corning, New York, USA) foram revestidos com concentrações crescentes de antígeno toxoplásmico (0.01 a 6 µg/ml) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0.1M, pH = 9.6. Após incubação das placas, por 1 hora, à temperatura ambiente e, por 16 horas, a 4°C, os orifícios foram lavados 3 vezes com SST-Tw, e aos mesmos foram adicionados 200 µl de um pool de soros humanos, contendo anticorpos IgA anti-*T. gondii*, diluído a 1/25 em SST-Tw contendo 0.1% de albumina sérica bovina. Após incubação das placas por 1 1/2 hora, à temperatura ambiente,

os orifícios foram lavados, como já descrito, e aos mesmos foram adicionados 200 µl do conjugado (soro de cabra contendo anticorpos anti-IgA humana marcados com peroxidase) diluído a 1:700 em SST-Tw. As placas foram incubadas, por 1 hora, à temperatura ambiente, os seus orifícios lavados, como já descrito, e aos mesmos foram adicionados 200 µl do sistema substrato (TMB/H₂O₂). Após incubação das placas por 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro, as reações foram bloqueadas adicionando-se aos orifícios 50 µl de H₂SO₄ 4N. As absorbâncias das reações foram lidas a 450 nm, conforme descrito anteriormente.

5.2.5. Concentração ótima do sistema substrato

A concentração dos reagentes do sistema substrato usada no presente estudo, foi baseada no trabalho de Hancock & Tsang (1986). A solução continha 1.42 mM de H₂O₂ e 0.42mM de TMB, em tampão acetato de sódio-ácido acético glacial 0.1M, pH = 5.5. A solução foi preparada, sempre, 5 minutos antes da sua utilização.

5.3. Obtenção de soros padrões com atividades de anticorpos definida

Um soro de referência para IgA foi preparado misturando-se partes iguais de soros de 8 indivíduos com toxoplasmose aguda. Todos os soros componentes do pool exibiam anticorpos IgA anti-*T.gondii* detectados por ELISAd. Este soro de referência foi designado como tendo, arbitrariamente, 1.000 unidades de atividade de anticorpo/ml (U/ml). Padrões com atividades de 2 a 900 U/ml foram preparados, diluindo-se o soro de referência com um pool de soros de indivíduos saudáveis com sorologia negativa para toxoplasmose. Em todos os testes, foram incluídos controles contendo de 2 a 1000 U/ml, de modo a se obter uma curva padrão.

5.4. Absorção dos soros com proteína G

Sepharose 4B-proteína G foi lavada com SST e o gel foi ressuspendido em SST, de modo a se obter uma suspensão a 25%. Em tubos de ensaio, foram misturados 0,6 ml da suspensão do gel e 50 ul das amostras de soros. Os tubos foram deixados por 30 minutos, à temperatura ambiente, com homogeneização periódica de 5 em 5 minutos, e a seguir, deixados em repouso por 16 h, a 4°C. Os sobrenadantes foram retirados, cuidadosamente, com o auxílio de micropipetas, e centrifugados a 2.300 rpm, por 15 min. Os sobrenadantes (soros absorvidos, diluídos a 1/10) foram retirados, cuidadosamente, com o auxílio de micropipetas, e estocados a -80 °C até o momento de uso.

5.5. Procedimento utilizado na técnica de ELISA

Aos orifícios de placas de poliestireno de fundo plano (Corning, New York, USA), foram adicionados 200 ul de uma solução contendo 3ug/ml de antígeno toxoplásmico em tampão carbonato-bicarbonato, 0.1M, pH = 9.6. Após incubação das placas, por 1 hora, a temperatura ambiente e, por 16 horas, a 4°C, os orifícios foram lavados 3 vezes com SST-Tw, e aos mesmos foram adicionados 200 ul das amostras de soros tratadas com proteína G, diluídas a 1/5 em SST-Tw contendo 1% de albumina sérica bovina (diluição final dos soros de 1/50). Após incubação das placas, por 1½ hora, à temperatura ambiente, os orifícios foram lavados com SST-Tw, como já descrito, e aos mesmos foram adicionados 200 ul do conjugado (soro de cabra contendo anticorpos anti-IgA humana marcados com peroxidase) diluído a 1:700 em SST-Tw. As placas foram incubadas, por 1 hora, à temperatura ambiente, os orifícios lavados como já descrito, e aos mesmos adicionados 200 ul do sistema substrato (TMB/H₂O₂). Após incubação das placas, por 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro, as reações foram bloqueadas adicionando-se aos orifícios 50 ul de H₂SO₄ 4N. As absorbâncias das reações foram lidas, a 450 nm, em uma leitora de placas de ELISA (Eti-System Reader, Sorin Biomedica). Em cada ensaio, foram incluídos soros

padrões contendo atividades conhecidas de anticorpos, em termos de U/ml. Cada soro foi testado em triplicata e a média das absorbâncias obtidas foi transformada em U/ml utilizando a curva padrão. O cut-off das reações foi determinado utilizando-se o índice J (YOU DEN, 1950).

5.6. Variação intra-ensaio

Para determinar a variação intra-ensaio, um soro padrão com 200 U/ml foi diluído a 1/50, como já descrito, e ,então, dispensado em 30 orifícios de uma placa de ELISA revestidos com o antígeno toxoplásmico. Cada orifício recebeu 200 μ l do soro padrão diluído, utilizando uma micropipeta automática de precisão. Os demais passos da reação foram realizados, como já descrito. O coeficiente médio de variação intra-ensaio foi determinado utilizando-se as absorbâncias obtidas.

5.7. Variação inter-ensaio

A variação inter-ensaio foi determinada pelos resultados obtidos com 8 análises, em triplicata, de um soro padrão contendo 200 U/ml realizadas num período de 15 dias. As condições de realização da técnica, já foram descritas nos itens anteriores.

5.8. Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Lowry (LOWRY et al, 1951).

6. ELISA de captura (ELISAc) para a pesquisa de anticorpos IgA anti-*T.gondii*

A pesquisa de anticorpos IgA anti-*T. gondii* através de ELISAc foi realizada utilizando-se kits comerciais Eti-Toxok-A (Sorin Biomedica, Itália). Resumidamente, aos orifícios de placas de poliestireno revestidos com anticorpos IgG de coelho anti-IgA humana, foram adicionados 100 µl das amostras de soros diluídas a 1:101. Após a incubação das placas, por 1 hora, a 37°C, e lavagem dos orifícios com SST-Tw, 100 µl de uma solução contendo antígeno toxoplásmico e IgG monoclonal de camundongo anti-*T. gondii* marcada com peroxidase, foram adicionados aos orifícios. Após incubação das placas, por 1 hora, a 37°C, os orifícios foram lavados com SST-Tw, e aos mesmos foram adicionados 100 µl do sistema substrato (TMB/H₂O₂). As placas foram incubadas, por 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro, e as reações foram bloqueadas adicionando-se aos orifícios 200 µl de H₂SO₄ 1N. As absorbâncias das reações foram lidas a 450, 630 nm em uma leitora de placas de ELISA (Eti-System Reader, Sorin Biomedica). Em todos os ensaios foram incluídos soros controles, contendo atividades conhecidas de IgA anti-*T. gondii*, expressas em unidades arbitrárias por ml de soro (UA/ml), de modo a permitir a construção de uma curva padrão. Esta curva foi utilizada para transformar as absorbâncias obtidas em UA/ml. De acordo com as instruções do kit, as amostras de soros com valores inferiores a 10 UA/ml são consideradas negativas. Reações com resultados de IgA variando de 10 a 40 UA/ml não podem ser consideradas negativas devendo a significância das mesmas ser interpretada em conjunto com os níveis de anticorpos específicos das classes IgM e IgG. Ainda, de acordo com as instruções do kit, a grande maioria dos pacientes com toxoplasmose aguda apresenta níveis de IgA superiores a 40 UA/ml.

7. Imunocaptura-aglutinação (IC-A) para a pesquisa de anticorpos IgA anti-*T. gondii*

7.1. Obtenção da preparação antigênica

As formas taquizoítas de *T.gondii* foram obtidas do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados com o parasita, conforme já descrito. A preparação antigênica foi obtida de acordo com Desmonts, Naot & Remington (1981). Resumidamente, após várias lavagens dos parasitas com SST, a 2.300 rpm, por 15 minutos, a 4°C, o precipitado da última centrifugação foi ressuscitado em uma solução de formaldeído diluído a 1/5 em SST. O material foi mantido a 4°C, com agitação ocasional, durante 4 horas, e, então, deixado em repouso até o dia seguinte. A seguir, a suspensão de parasitas formolizados foi lavada, 4 vezes, por centrifugação, a 2.300 rpm, por 15 minutos, a 4°C, e o precipitado da última centrifugação foi ressuscitado em 5 ml de uma solução alcalina tamponada, pH = 8.7 (SAT) (NaCl 0.12N, H₃BO₃ 0.05N, NaOH 0.24N, albumina sérica bovina 0.4% e azida sódica 0.1%). Uma alíquota da preparação foi retirada para a determinação da concentração dos parasitas e o restante do material foi estocado a 4°C até o momento do uso.

7.2. Procedimento utilizado na técnica de IC-A

A técnica de IC-A foi realizada seguindo-se o protocolo idealizado por outros autores (DESMONTS, NAOT & REMINGTON, 1981; PUJOL, MOREL & MALBRUNY, 1989). Resumidamente, orifícios de placas de poliestireno de fundo em U (Corning, New York, USA) foram revestidos com anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgA humana (Biosoft, França). Após o bloqueio dos sítios de ligação residuais no poliestireno com albumina sérica bovina, 100 ul das amostras de soros diluídas em SST-Tw foram aplicados aos orifícios e as placas foram incubadas, por 3 horas, a 37°C, em uma câmara úmida. Após lavagem dos orifícios com SST-Tw, 100 ul de uma suspensão de formas taquizoítas

formolizadas contendo 1.5×10^7 parasitas/ml foram adicionados aos orifícios e as placas foram incubadas, por 16 horas, a 37°C , em câmara úmida. Em cada ensaio, foram incluídos um controle negativo, um controle positivo e um controle de antígeno. Foram consideradas positivas as reações que apresentavam um padrão de sedimentação dos parasitas similar àquele observado nas reações de aglutinação.

Estudos preliminares mostraram que todas as amostras de soros dos pacientes com infecções heterólogas apresentavam reações de IC-A negativas com soros diluídos a 1:100. Por outro lado, vários soros de pacientes com toxoplasmose aguda apresentavam títulos de anticorpos relativamente altos (> 6.400). Baseado nestes experimentos, a técnica de IC-A para IgA foi realizada com os soros diluídos de 1:100 a 1:1600.

Casuística

1. Amostras de soros utilizadas para a avaliação das sensibilidades e especificidades das reações de ELISAd, ELISAc e IC-A

1.1. Amostras de soros de pacientes

As amostras de soros foram obtidas dos seguintes grupos de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP (HC/UNICAMP):

Grupo I: 54 pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda adquirida

Cinquenta e dois pacientes, com idade variando de 4 a 67 anos, apresentavam linfadenomegalia entre as manifestações clínicas. Todos estes pacientes apresentavam níveis significativos de anticorpos IgM anti *T.gondii* detectados por IFI (títulos de 32 à 8.192) e ELISAc. Em 22 destes pacientes, foi observada elevação significativa dos títulos de IFI para IgG anti-*T.gondii*. Os outros dois pacientes incluídos no grupo, não apresentavam linfadenomegalia ao exame físico. Em um deles, com 12 anos de idade, níveis significativos de anticorpos específicos da classe IgM (IFI=512, ELISAc=reagente),

foram encontrados em uma amostra de sangue coletada, aproximadamente, 1 ½ mês após um quadro gripal. No outro paciente, com idade de 28 anos, relatando emagrecimento, as reações de IFI e ELISAc apresentavam níveis significativos de anticorpos IgM anti-*T.gondii*. Além disto, em amostras sequenciais de sangue do paciente, foi observada uma elevação significativa dos títulos de IgM por IFI.

Grupo II: 8 pacientes com mononucleose infecciosa

Todos os pacientes apresentavam suspeita clínica de mononucleose infecciosa e reações de Hoff-Bauer e Paul-Bunnell-Davidson compatíveis com a doença.

Grupo III: 10 pacientes com rubéola

Todos os pacientes apresentavam dados clínicos sugestivos de rubéola e anticorpos IgM específicos detectados por ELISAc (ETI-RUBEK-M, Sorin Biomédica, Itália).

Grupo IV: 10 pacientes com hepatite B

Dos 10 pacientes, 7 apresentavam história clínica de hepatite B e 3 eram assintomáticos. Em todos os pacientes foram detectados os marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBcAg. Sete pacientes apresentavam pesquisa de HBeAg positiva e anti-HBeAg negativa. Anti-HBsAg não foi detectado em nenhum dos pacientes. Todos os marcadores sorológicos foram pesquisados utilizando-se kits comerciais da marca Sorin (Sorin Biomédica, Itália).

Grupo V: 5 pacientes com hepatite A

Todos os pacientes apresentavam dados clínicos sugestivos de hepatite viral. Em todos os pacientes foram detectados anticorpos IgM específicos para o vírus da hepatite A, utilizando-se kits comerciais da marca ABBOTT (ABBOTT Laboratories Diagnostic Division, USA).

Grupo VI: 7 pacientes com doença de inclusão citomegálica

Dos 7 pacientes, 5 apresentavam suspeita clínica de doença de inclusão citomegálica e 2 eram assintomáticos (1 hemofílico e 1 HIV positivo). Todos os pacientes apresentavam anticorpos IgM e IgG específicos para o vírus da doença de inclusão citomegálica (CMV) detectados através de ELISA, utilizando-se kits comerciais da marca Sorin (Sorin Biomédica, Itália).

Grupo VII: 4 pacientes com doença de Chagas

Três pacientes apresentavam megaesôfago e um paciente apresentava, somente, dados epidemiológicos positivos para a doença de Chagas. Em todos os pacientes foram encontrados títulos de anticorpos IgG anti-*T.cruzi* superiores a 80 por IFI e títulos de anticorpos totais anti-*T.cruzi* superiores a 2 por RFC.

Grupo VIII: 6 pacientes com sífilis

Dos 6 pacientes, 5 apresentavam suspeita clínica de sífilis e 1 era assintomático. Todos os pacientes apresentavam reações de VDRL reagentes (títulos variando de 2 a 32) e pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* positiva pela reação de hemaglutinação passiva (TPHA).

1.2. Amostras de soros de pessoas sadias

Amostras de soros de 27 pessoas sadias foram obtidas de alunos da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e de funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do HC-UNICAMP. Nenhuma das pessoas apresentava história clínica sugestiva de toxoplasmose aguda. Todas as pessoas foram submetidas a testes sorológicos para toxoplasmose e em nenhum caso foi encontrada evidência sorológica de infecção aguda.

Todas as amostras de soros foram mantidas a - 80°C até o momento do uso.

2. Avaliação da persistência dos anticorpos específicos das classes IgA e IgM após a infecção com *T.gondii*

A persistência dos anticorpos específicos da classe IgA, detectados por ELISAd, ELISAc e IC-A, e dos anticorpos específicos da classe IgM detectados por IFI e ELISAc e QmL, foram determinadas utilizando-se amostras sequenciais de soros de 10 pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda adquirida (pacientes 1 a 10 do GRUPO I) A seguir, são descritos, para cada paciente, os intervalos de tempo, em dias, decorridos entre o início das manifestações clínicas da infecção e a coleta das amostras de sangue.

Pacientes do Grupo I (n = 10)	Intervalo de tempo (dias) entre as manifestações clínicas da toxoplasmose e a coleta das amostras de sangue.
1	19,109,152,270 e 435
2	19,74,103,131 e 180
3	30,63,93,124,209 e 270
4	18,38,63,98 e 258
5	30,74,287,355,460,e,617
6	22,85,151,210,270,327,360 e 483
7	104,172,234,298 e 360
8	153,210,339,422 e 595
9	43,98,250,318 e 618
10	51,63,113,153,223 e 242

4. Resultados

ELISAd para pesquisa de IgA anti *T. gondii*

1. Determinação das concentrações ótimas dos reagentes.

1.1. Determinação da concentração ótima de antígeno

Para a determinação da concentração ótima de antígeno toxoplásmico para o revestimento das placas de ELISA, quantidades variáveis de antígeno foram testadas e os resultados obtidos estão representados na Figura 1.

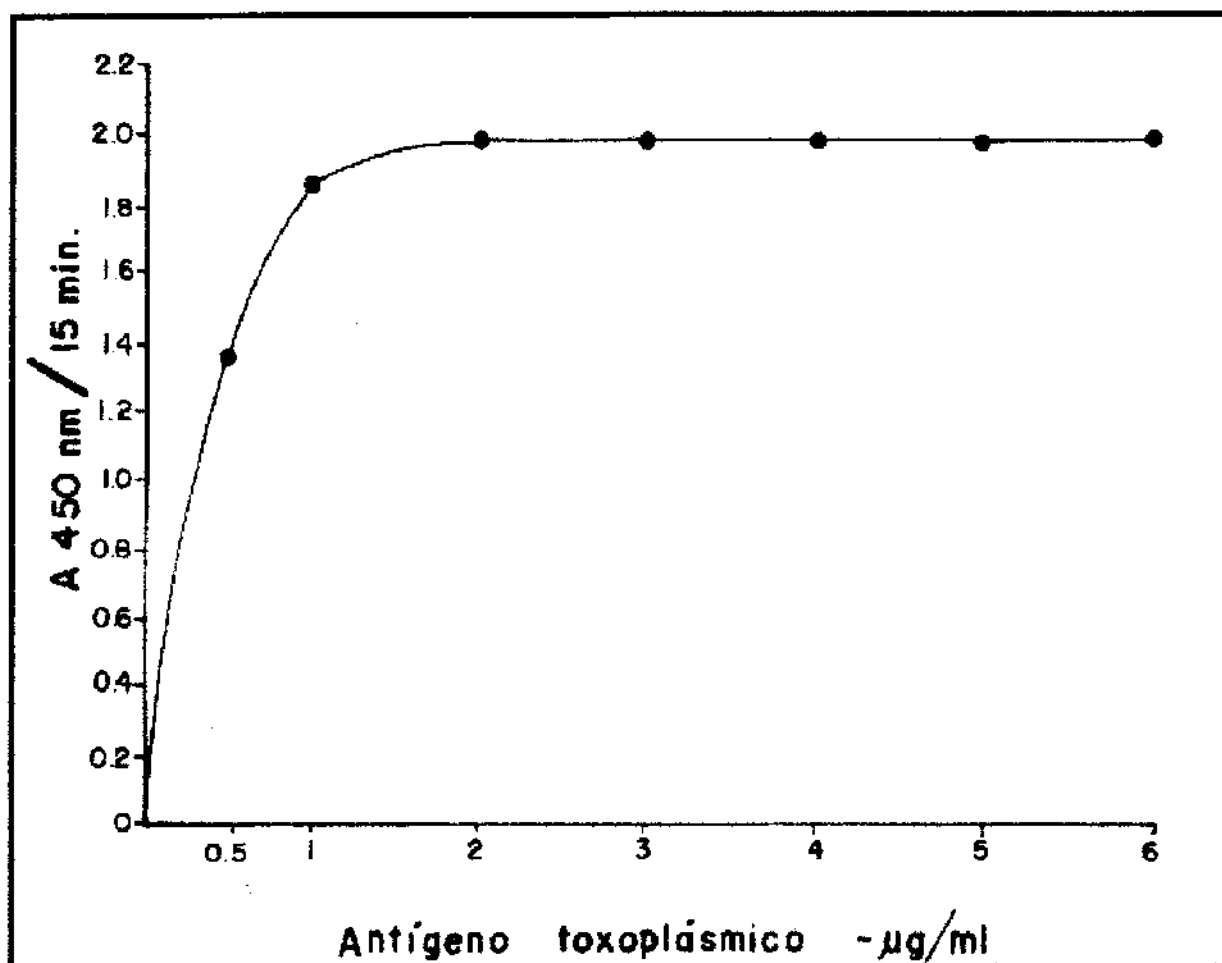


Fig.1 - Titulação do antígeno toxoplásmico por ELISAd. Os orifícios da placa de ELISA foram revestidos com diferentes concentrações de antígeno toxoplásmico (0,1 a 6 µg/ml). O conjugado foi diluído a 1:700 em PBS-Tw. TMB foi utilizado como substrato. As reações foram bloqueadas com H_2SO_4 e a intensidade de conversão do substrato foi medida a 450 nm.

Como pode ser observado, a partir de 2 ug de antígeno/ml não houve aumento das D.O das reações. Para a técnica de ELISAd, utilizou-se uma concentração de 3 ug de antígeno/ml.

1.2. Determinação da concentração ótima do conjugado

Para a determinação da concentração ótima do conjugado (soro de cabra contendo anticorpos anti-IgA humana marcados com peroxidase), diferentes concentrações do mesmo foram testadas e os resultados estão representados na Figura 2.

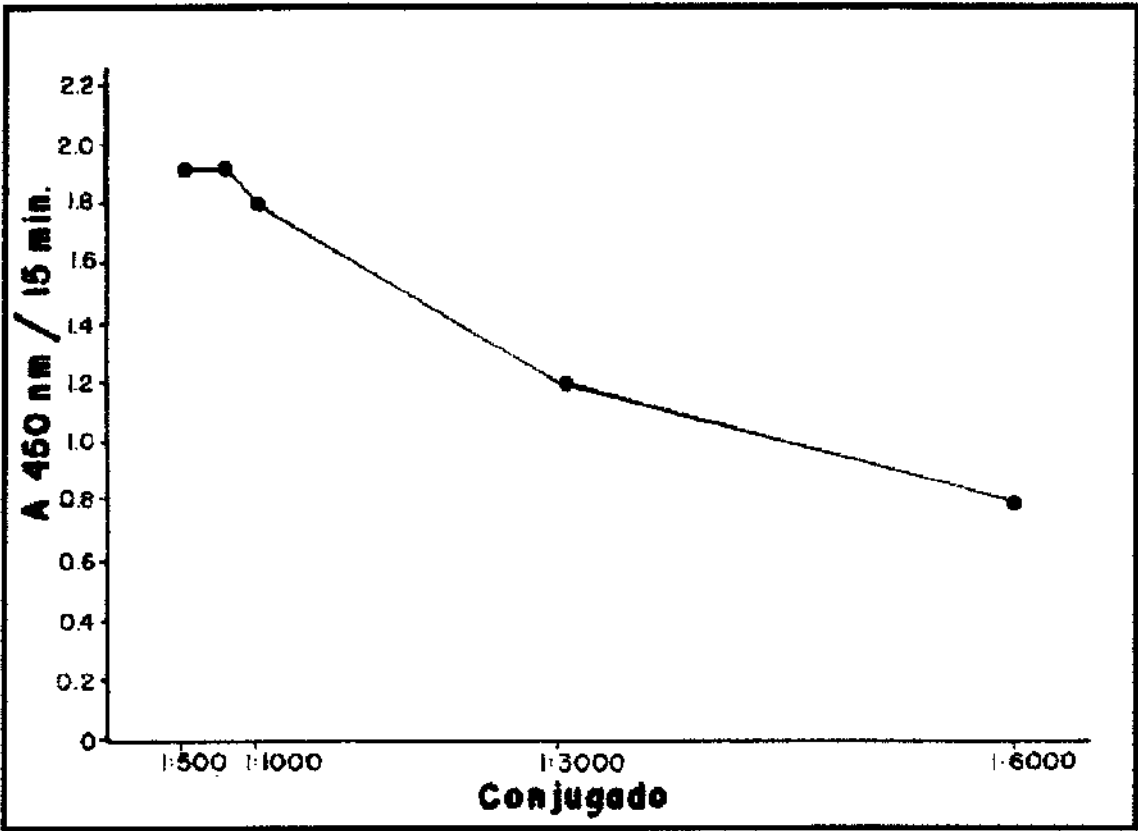


Fig.2 - Titulação do conjugado (soro de cabra contendo anticorpos anti-IgA humana marcados com peroxidase). Os orifícios da placa de ELISA foram revestidos com antígeno toxoplásmico diluído a 3 ug/ml. Diferentes diluições do conjugado, variando de 1:500 a 1:6.000, foram testadas. TMB foi utilizado como substrato. As reações foram bloqueadas com H₂SO₄ e a intensidade de conversão do substrato foi medida a 450 nm.

Como pode ser observado, diluições do conjugado superiores a 1:750 resultaram em diminuição das D.O. das reações. Para a técnica de ELISAd, utilizou-se o conjugado diluído a 1:700 em SST-Tw.

1.3. Variação intra e inter-ensaio

As variações intra e inter-ensaio da técnica ELISAd foram, respectivamente, 4,9% e 10,4%.

Determinação das sensibilidades e especificidades das técnicas ELISAd, ELISAc e IC-A para a pesquisa de anticorpos IgA anti-*T. gondii*

A sensibilidade de cada técnica foi determinada pela análise de 54 soros de pacientes com toxoplasmose aguda adquirida (Grupo I). A especificidade de cada técnica foi determinada pela análise de 50 soros de pacientes com infecções heterólogas (Grupos II ao VIII) e de 27 soros de pessoas saudáveis.

Os resultados obtidos com a pesquisa de IgA anti-*T.gondii* por ELISAd nos pacientes com toxoplasmose aguda adquirida, nos pacientes com infecções heterólogas e nas pessoas saudáveis, são mostrados na Figura 3. A Tabela I mostra os resultados obtidos com as técnicas de ELISAd, ELISAc e IC-A para IgA, os resultados das reações de IFI e ELISAc para IgM e os resultados das reações de IFI para IgG nos pacientes com toxoplasmose aguda adquirida. Na tabela II, são apresentados os resultados obtidos com as técnicas de ELISAd, ELISAc e IC-A para IgA nos pacientes com infecções heterólogas. A Tabela III mostra os resultados da pesquisa de IgA nas pessoas saudáveis.

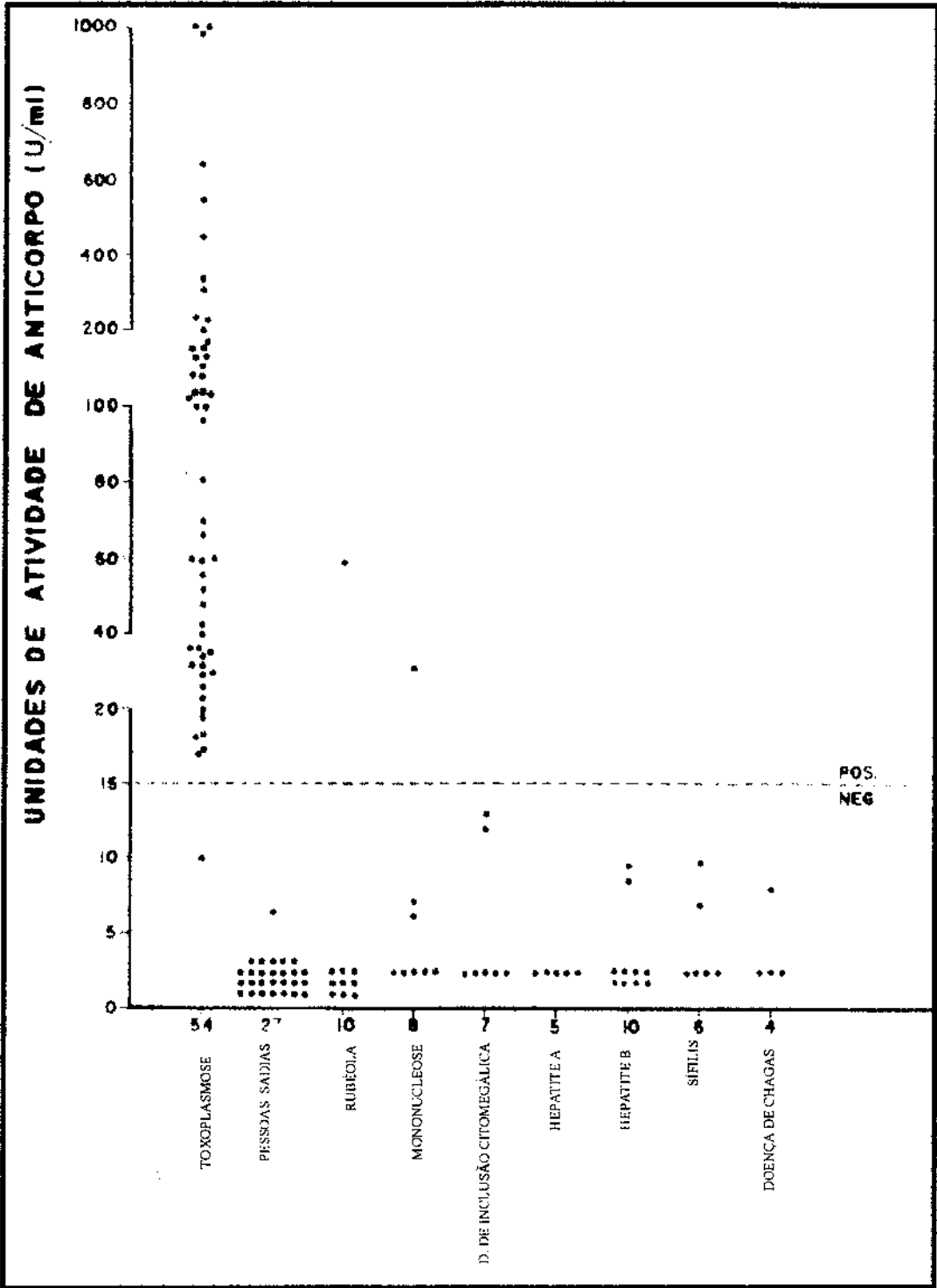


Fig.3. Resultados da pesquisa de IgA anti-*T.gondii* por ELISAd em 54 pacientes com toxoplasmose aguda adquirida, 50 pacientes com infecções heterólogas e 27 pessoas sadias.

Tabela I : Detecção de anticorpos IgM, IgG e IgA anti-*T.gondii* em pacientes com toxoplasmose aguda adquirida.

Pacientes	Linfonodos Envolvidos	Resultados dos testes sorológicos					
		IgM		IgG		IgA	
		IFI (Título de Ac)	ELISAc (R/NR)	IFI (Título de Ac)	ELISAd (U/ml)	ELISAc (UA/ml)	IC-A (Título de Ac)
1 *	C,SO,SC,A,I	4.096	R	32	130	>160	>1.600
2 *	C,SO,SC,I	8.192	R	2.048	204	>160	>1.600
3 *	SM	1.024	R	8.192	118	>160	>1.600
4 *	C,A	1.024	R	64	640	>160	>1.600
5 *	C,A,SO	512	R	8.192	40	>160	>1.600
6 *	C,A,I	4.096	R	4.096	20	>160	>1.600
7 *	C,SO,A	256	R	2.048	10	64	>1.600
8	C	32	R	8.192	18	40	ND
9	-	32	R	16.383	118	>160	>1.600
10	-	512	R	32.761	43	>160	ND
11	C,A	2.048	R	4.096	82	>160	>1.600
12	C	512	R	8.192	200	>160	>1.600
13	C	256	R	32.768	27	130	>1.600
14 *	SM	2.048	R	8.192	168	>160	>1.600
15	C,A,I	64	R	16.384	29	>160	>1.600
16 *	C,I	8.192	R	4.096	96	>160	>1.600
17	C,SO,I	256	R	8.192	56	116	>1.600
18	C	256	R	32.768	100	>160	>1.600
19	S,SO	64	R	131.072	115	>160	>1.600
20	C,SO,A,I	4.096	R	16.384	70	>160	>1.600
21 *	C,A	4.096	R	1.024	1.000	>160	>1.600
22	C	1.024	R	8.192	180	>160	>1.600
23	C,A,I	256	R	8.192	31	>160	>1.600
24	I	128	R	32.768	48	116	>1.600
25	C,I	1.024	R	16.384	100	>160	>1.600
26	SO,I	256	R	32.768	19	>160	>1.600
27 *	C	128	R	NR	66	>160	>1.600
28	SC,A	64	R	131.072	436	109	>1.600
29	C,SO,A	128	R	8.192	30	156	>1.600
30 *	C	128	R	NR	222	>160	>1.600
31	C,SO,A,I	4.096	R	4.096	340	>160	>1.600
32	C	64	R	8.192	34	>160	>1.600
33 *	C,A	512	R	1.024	36	>160	>1.600
34	C,A	512	R	4.096	120	>160	>1.600
35	C,A,I	2.048	R	131.072	17	>160	>1.600
36 *	C,SO	128	R	8.192	37	74	>1.600
37 *	C,A,I	8.192	R	4.096	304	>160	>1.600

Tabela I (continuação): Detecção de anticorpos IgM, IgG e IgA anti-*T.gondii* em pacientes com toxoplasmose aguda adquirida

Pacientes	Linfonodos Envolvidos	Resultados dos testes sorológicos					
		IgM		IgG	IgA		
		IFI (Título de Ac)	ELISAc (R/NR)	IFI (Título de Ac)	ELISAd (U/ml)	ELISAc (UA/ml)	IC-A (Título de Ac)
38	C,A	4.096	R	65.536	34	>160	>1.600
39	C,SC,A	1.024	R	65.536	37	>160	>1.600
40	C,I	1.024	R	64	59	>160	>1.600
41 *	C,A,I	4.096	R	2.048	176	>160	>1.600
42 *	C,SO,A,I	8.192	R	1.024	172	>160	>1.600
43 *	C	512	R	2.048	60	>160	>1.600
44	C	1.024	R	1.024	120	>160	>1.600
45	C	256	R	65.536	18	98	>1.600
46 *	C	1.024	R	8.192	52	>160	>1.600
47 *	C,A	1.024	R	256	550	>160	>1.600
48	C,A,I	2.048	R	16.384	22	>160	>1.600
49 *	C,SO,A	1.024	R	4.096	>1.000	102	>1.600
50 *	C,A	8.192	R	64	152	>160	>1.600
51	C	2.048	R	4.096	158	>160	>1.600
52	C	256	R	65.536	60	>160	>1.600
53	C,A	512	R	131.072	>1.000	114	>1.600
54	C,SO,I	256	R	32.768	17	110	>1.600

Anticorpos anti-*T.gondii* foram pesquisados em soros de 54 pacientes com toxoplasmose aguda adquirida. Os anticorpos da classe IgM foram detectados através da IFI e ELISAc; os anticorpos da classe IgG foram detectados através da IFI e os da classe IgA através de ELISAd, ELISAc e IC-A. Dos 54 pacientes estudados, 52 apresentavam linfadenomegalia. Os sítios dos linfonodos envolvidos estão representados pelas seguintes abreviaturas: C = cervical; A = axilar; SO = suboccipital; SM = submandibular; I = inguinal e SC = supraclavicular. Níveis significativos de anticorpos: IFI (IgM) ≥ 32; ELISAc (IgM) R; ELISAd (IgA) > 15 U/ml; ELISAc (IgA) ≥10 UA/ml (de acordo com as instruções do kit, níveis de anticorpos superiores a 40 UA/ml são encontrados na grande maioria dos pacientes com toxoplasmose aguda); IC-A (IgA) > 100.

* Pacientes com elevação significativa dos títulos de IgG anti-*T. gondii* por IFI.

R = Reagente; NR = Não Reagente; ND = Não Determinado; Ac = Anticorpos

Tabela II: Pesquisa de anticorpos IgA anti-*T.gondii* em pacientes com infecções heterólogas.

Infecção Heteróloga	Pacientes	IgA		
		ELISAd (U/ml)	ELISAc (UA/ml)	IC-A (Título de Ac)
Mononucleose	1	2.2	24.0	< 100
	2	1.7	1.0	< 100
	3	7.2	2.0	< 100
	4	31.0	1.9	< 100
	5	1.6	2.0	< 100
	6	6.4	2.0	< 100
	7	3.8	2.5	< 100
	8	1.2	2.5	< 100
Rubéola	1	59.0	4.0	< 100
	2	4.8	4.0	< 100
	3	4.6	4.0	< 100
	4	2.6	6.0	< 100
	5	3.8	5.0	< 100
	6	3.1	4.0	< 100
	7	3.8	6.0	< 100
	8	3.0	6.0	< 100
	9	1.8	4.5	< 100
	10	1.5	4.5	< 100
Doença de Inclusão Citomegálica	1	13.0	0.4	< 100
	2	2.4	5.0	< 100
	3	12.2	1.1	< 100
	4	3.4	5.0	< 100
	5	2.8	5.0	< 100
	6	1.8	5.0	< 100
	7	2.6	7.0	< 100
Hepatite B	1	8.4	3.0	< 100
	2	4.4	3.0	< 100
	3	3.4	2.5	< 100
	4	2.2	3.0	< 100
	5	2.1	2.5	< 100
	6	4.1	4.0	< 100
	7	1.5	3.0	< 100
	8	3.4	4.5	< 100
	9	9.5	2.0	< 100
	10	0.6	4.5	< 100
Hepatite A	1	1.8	5.0	< 100
	2	5.4	4.0	< 100
	3	2.4	5.5	< 100
	4	4.8	6.0	< 100
	5	0.9	5.5	< 100

Tabela II (continuação): Pesquisa de anticorpos IgA anti-*T.gondii* em pacientes com infecções heterólogas.

Infecção Heteróloga	Pacientes	IgA		
		ELISAd (U/ml)	ELISAc (UA/ml)	IC-A (Título de Ac)
Sífilis	1	4.1	3.0	< 100
	2	2.9	5.0	< 100
	3	10.0	2.3	< 100
	4	7.0	2.5	< 100
	5	0.9	2.0	< 100
	6	1.2	2.5	< 100
Doença de Chagas	1	3.4	5.0	< 100
	2	2.5	4.0	< 100
	3	3.6	3.0	< 100
	4	7.8	1.7	< 100

Anticorpos IgA anti-*T.gondii* foram pesquisados em amostras de soros de 50 pacientes com infecções heterólogas através das técnicas de ELISAd, ELISAc e IC-A. Níveis significativos de anticorpos: ELISAd > 15 U/ml; ELISAc ≥ 10 UA/ml (de acordo com as instruções do kit, níveis de anticorpos superiores a 40 UA/ml são encontrados na grande maioria dos pacientes com toxoplasmose aguda) ; IC-A > 100.

Tabela III : Pesquisa de anticorpos IgA anti-*T.gondii* em pessoas sadias.

Pessoas sadias	IgA		
	ELISAd (U/ml)	ELISAc (UA/ml)	IC-A (Título de Ac)
1	1.2	6.0	<100
2	3.5	6.0	<100
3	3.1	9.0	<100
4	0.8	8.0	<100
5	4.9	8.0	<100
6	4.6	5.5	<100
7	5.0	8.0	<100
8	1.1	8.0	<100
9	3.6	7.0	<100
10	2.6	8.5	<100
11	0.9	7.0	<100
12	0.1	0.6	<100
13	2.0	7.0	<100
14	1.8	5.0	<100
15	4.1	7.0	<100
16	3.9	9.0	<100
17	1.2	5.5	<100
18	3.5	9.0	<100
19	0.5	5.0	<100
20	1.0	7.0	<100
21	0.6	8.5	<100
22	0.3	8.5	<100
23	3.0	9.0	<100
24	6.5	6.0	<100
25	1.2	8.5	<100
26	4.0	7.0	<100
27	1.8	6.0	<100

Anticorpos IgA anti-*T.gondii* foram pesquisados em amostras de soros de 27 pessoas sadias através das técnicas de ELISAd, ELISAc e IC-A. Níveis significativos de anticorpos : ELISAd > 15 U/ml; ELISAc ≥ 10 UA/ml (de acordo com as instruções do kit, níveis de anticorpos superiores a 40 UA/ml são encontrados na grande maioria dos pacientes com toxoplasmose aguda) ; IC-A > 100.

ELISAd

Os soros dos pacientes com toxoplasmose aguda exibiram atividades de anticorpos variando de 10 a 1.000 U/ml. O "cut-off" da reação foi calculado com base no índice J através da seguinte fórmula: índice $J = (a/b) + (c/d) - 1$, onde a=número de pacientes infectados apresentando sorologia positiva, b=número total de pacientes infectados incluídos no estudo, c=número de pessoas não infectadas com sorologia negativa e d=número total de pessoas não infectadas incluídas no estudo. O índice J foi calculado para valores de cut-off variando de 10 a 20 U/ml. O maior índice J obtido foi 0,955, correspondente a um valor de cut-off de 15 U/ml. Utilizando este valor de cut-off, a sensibilidade e especificidade do teste foram, respectivamente, 98.15% e 97.40%.

Um soro de um paciente com toxoplasmose aguda apresentou atividade de anticorpo abaixo do valor do cut-off da técnica (soro do paciente 7 com 10 U/ml). Neste soro foram detectados níveis significativos de anticorpos específicos da classe IgM por IFI e ELISAc e de anticorpos específicos da classe IgA por ELISAc e IC-A (Tab.I). Este soro foi obtido de um paciente incluído no estudo da persistência de anticorpos específicos após a infecção com *T.gondii*. A análise de amostras sequenciais de soros obtidas do paciente revelou elevação significativa dos títulos de IgG por IFI e posituação da reação de ELISAd para IgA (Tab IV). Por estas razões, o soro do paciente 7, com ELISAd apresentando 10 U/ml, foi considerado falso-negativo.

Com a técnica de ELISAd, 2 soros de pacientes com infecções heterólogas apresentaram níveis de reatividade acima do valor do cut-off da técnica: um soro de um paciente com mononucleose infecciosa (31 U/ml) e um soro de um paciente com rubéola (59 U/ml). Nestes dois soros, não foram detectados níveis significativos de anticorpos IgA anti-*T.gondii* por ELISAc e IC-A (Tab. II). No soro do paciente com mononucleose, também, não foram detectados anticorpos anti-*T.gondii* das classes IgM e IgG. O paciente com rubéola apresentava história clínica e manifestações clínicas compatíveis com a infecção aguda pelo vírus da rubéola. O diagnóstico clínico foi confirmado pela detecção de anticorpos IgM anti-vírus da rubéola, através de uma técnica de ELISAc. Em amostras sequenciais de soros obtidas deste paciente, anticorpos IgM anti-*T.gondii* não foram

detectados por IFI e ELISAc e um título estável de 128 foi encontrado por IFI na pesquisa de IgG anti-*T.gondii*. Por estas razões, o soro do paciente com mononucleose infecciosa e o soro do paciente com rubéola foram considerados falso-positivos quando analisados por ELISAd para a pesquisa de IgA anti-*T.gondii*.

Todos os soros de pessoas sadias apresentaram atividades de anticorpos inferiores a 15 U/ml, variando de 0.1 a 6.5 U/ml (Tab. III).

ELISAc

A técnica de ELISAc foi realizada, utilizando-se kits comerciais da marca Sorin (ETI-TOXOK M). De acordo com as instruções do kit, soros apresentando níveis de IgA inferiores a 10 UA/ml são considerados negativos. Ainda de acordo com as instruções do kit, a grande maioria dos pacientes com toxoplasmose aguda apresenta nível de IgA superior a 40 UA/ml.

Os resultados obtidos com a análise dos soros dos pacientes com toxoplasmose aguda por ELISAc são apresentados na Tabela I. Como pode ser observado, todos os soros exibiram níveis de reatividade superiores a 10 UA/ml, variando de 40 a > 160 UA/ml. Todos os soros de pessoas sadias apresentaram níveis de anticorpos inferiores a 10 UA/ml (Tab. III). Com exceção de um soro de um paciente com mononucleose infecciosa apresentando um nível de reatividade de 24 UA/ml, todos os soros de pacientes com infecções heterólogas apresentaram níveis de anticorpos inferiores a 10 UA/ml (Tab. II). No soro do paciente com mononucleose infecciosa, as reações ELISAd e IC-A para a pesquisa de anticorpos IgA e as reações de IFI e ELISAc para pesquisa de anticorpos IgM foram negativas. Deste modo, o soro do paciente com mononucleose infecciosa foi considerado falso-positivo quando analisado por ELISAc para a pesquisa de IgA anti-*T.gondii*. Considerando os resultados obtidos, a sensibilidade e especificidade obtidas com a técnica de ELISAc foram, respectivamente, 100% e 98.76%.

IC-A

Os resultados obtidos com a análise dos soros dos pacientes com toxoplasmose aguda por IC-A são mostrados na Tab.I. Como pode ser observado, com exceção de 2 casos onde a pesquisa de IgA por IC-A não foi realizada (soros dos pacientes 8 e 10), todos os soros exibiram títulos de anticorpos superiores a 1.600. Todos os soros dos pacientes com infecções heterólogas e todos os soros de pessoas sadias apresentaram reações não reagentes com os soros diluídos a 1:100 (Tab.II e III). Considerando os resultados obtidos, a técnica de IC-A apresentou 100% de sensibilidade e especificidade.

Persistência dos anticorpos específicos após a infecção com *T.gondii*

Os resultados obtidos com a pesquisa dos anticorpos IgA por ELISAd, ELISAc e IC-A e dos anticorpos IgM por IFI, ELISAc e QmL em amostras sequenciais de soros de 10 pacientes com toxoplasmose aguda adquirida (pacientes 1 a 10 do Grupo I), são apresentados na Tabela. IV. A Tabela IV mostra, também, as manifestações apresentadas pelos pacientes e os títulos de IFI para anticorpos IgG anti-*T.gondii* nas amostras sequenciais de soros estudadas.

Tabela IV: Persistência dos anticorpos específicos das classes IgM, IgG e IgA após a infecção com *T.gondii*.

Pacientes	Manifestações Clínicas	Dias após as manifestações clínicas	Resultados dos testes sorológicos						
			IgM			IgG		IgA	
			IFI (Título de Ac)	ELISAc (R/NR)	QmL (UA/ml)	IFI (Título de Ac)	ELISAd (U/ml)	ELISAc (UA/ml)	IC-A (Título de Ac)
1	Linfoadenomegalia	19	4.096	R	750	32	130	>160	>1.600
		109	32	R	360	32.768	54	28	>1.600
	Febre	152	64	R	ND	65.536	35	12	>1.600
		270	32	R	331	131.072	28	2	>1.600
	Cefaléia	435	< 16	NR	34	65.536	20	<1	>1.600
2	Linfoadenomegalia	19	8.192	R	>860	2.048	204	>160	>1.600
		74	4.096	R	ND	32.768	120	65	>1.600
	Febre	103	128	R	ND	131.072	118	24	>1.600
		131	< 16	R	ND	131.072	82	19	>1.600
		180	< 16	R	819	65.536	56	2	>1.600
3	Linfoadenomegalia	30	1.024	R	>860	8.192	118	>160	>1.600
		63	256	R	ND	32.768	40	>160	>1.600
	Febre	93	256	R	ND	32.768	42	48	>1.600
		124	< 16	R	450	65.536	44	39	>1.600
		209	< 16	R	320	131.072	36	34	>1.600
		270	< 16	NR	296	131.072	26	12	>1.600
4	Linfoadenomegalia	18	1.024	R	518	64	640	>160	>1.600
		38	2.048	R	ND	16.384	500	>160	>1.600
	Febre	63	256	R	ND	16.384	190	17	>1.600
		98	256	R	410	16.384	196	4	>1.600
		258	16	R	216	32.768	54	<1	>1.600
5	Linfoadenomegalia	30	512	R	>860	8.192	40	>160	>1.600
		74	128	R	ND	32.768	14	>160	>1.600
		287	< 16	R	580	32.768	8	25	>1.600
	Febre	355	< 16	R	530	32.768	10	21	>1.600
		460	< 16	R	ND	65.536	8	30	>1.600
		617	< 16	NR	481	32.768	6	28	>1.600
6	Linfoadenomegalia	22	4.096	R	829	4.096	20	>160	>1.600
		85	2.048	R	ND	16.384	ND	>160	ND
	Febre	151	512	R	550	8.192	ND	99	ND
		210	512	R	530	16.384	31	110	ND
	Emagrecimento	270	128	R	467	16.384	30	110	ND
		327	128	R	ND	16.384	21	52	ND
	Mialgia	360	256	R	338	65.536	19	51	ND
		483	64	R	298	8.192	6	17	>1.600

Tabela IV (continuação): Persistência dos anticorpos específicos das classes IgM, IgG e IgA após a infecção com *T.gondii*.

Pacientes	Manifestações Clínicas	Dias após as manifestações clínicas	Resultados dos testes sorológicos						
			IgM			IgG		IgA	
			IFI (Título de Ac)	ELISAc (R/NR)	QmL (UA/ml)	IFI (Título de Ac)	ELISAd (U/ml)	ELISAc (UA/ml)	IC-A (Título de Ac)
7	Linfadenomegalia Febre Dores articulares Adinamia	104	256	R	>860	2.048	10	64	>1.600
		172	256	R	630	8.192	62	60	ND
		234	128	R	582	16.384	53	39	ND
		298	64	R	ND	8.192	19	30	ND
		360	64	R	485	16.384	14	29	ND
8	Linfadenomegalia Febre	153	32	R	675	8.192	18	40	ND
		210	32	R	540	16.384	26	33	ND
		339	16	R	490	8.192	20	27	ND
		422	<16	R	ND	8.192	14	26	ND
		595	<16	R	213	16.384	9	20	ND
9	Emagrecimento	43	32	R	643	16.384	118	>160	>1.600
		98	256	R	ND	32.768	52	85	ND
		250	64	R	221	8.192	54	52	ND
		318	32	R	215	16.384	54	39	ND
		618	32	R	200	8.192	35	31	ND
10	Quadro gripal	51	512	R	>860	32.761	43	>160	ND
		63	512	R	ND	32.761	44	154	ND
		113	64	R	ND	16.384	41	56	ND
		153	32	R	791	8.192	26	29	ND
		223	32	R	750	4.096	60	27	ND
		242	32	R	738	4.096	60	19	ND

Os anticorpos anti-*T.gondii* foram pesquisados em amostras seriadas de soros de pacientes com infecção toxoplásmica. Os anticorpos da classe IgM foram detectados através de IFI, ELISAc e QmL, os da classe IgG através de IFI e os da classe IgA através de ELISAd, ELISAc e IC-A. As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes também estão descritas. Níveis significativos de anticorpos: IFI (IgM) ≥ 32 ; ELISAc (IgM) R; QmL (IgM) ≥ 140 UA/ml; ELISAd (IgA) >15 U/ml; ELISAc (IgA) ≥ 10 UA/ml (de acordo com as instruções do kit, níveis superiores a 40 UA/ml são encontrados na grande maioria dos pacientes com toxoplasmose aguda); IC-A (IgA) > 100 . R = Reagente; NR = Não Reagente; ND = Não Determinado; Ac = Anticorpos.

Considerando os resultados obtidos com a pesquisa de anticorpos específicos das classes IgA e IgM, podemos observar:

Paciente 1: As amostras de soros foram coletadas 19, 109, 152, 270 e 435 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de ELISAc para IgA foi positiva (≥ 10 UA/ml) nas amostras de soros coletadas até 152 dias após o início das manifestações clínicas. As reações de IFI, ELISAc e QmL para IgM foram positivas com as amostras coletadas até 270 dias, enquanto que, as reações de ELISAd e IC-A para IgA permaneceram positivas até a última amostra de soro testada, coletada 435 dias após o início das manifestações clínicas. Considerando na técnica de ELISAc para IgA níveis de anticorpos > 40 UA/ml como significativos para o diagnóstico da infecção aguda, a reação foi positiva, somente, com a amostra de soro coletada 19 dias após o início das manifestações clínicas da infecção.

Paciente 2: As amostras de soros foram coletadas 19, 74, 103, 131 e 180 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de IFI para IgM foi positiva nas amostras de soros coletadas até 103 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de ELISAc para IgA foi positiva com as amostras coletadas até 131 dias, enquanto que, as reações de ELISAc e QmL para IgM e as reações de ELISAd e IC-A para IgA foram positivas até a última amostra de soro testada, coletada 180 dias após o início das manifestações clínicas. Considerando na técnica de ELISAc para IgA, níveis de anticorpos > 40 UA/ml como significativos para o diagnóstico da infecção aguda, a reação foi positiva, somente, nas amostras de soros coletadas até 74 dias após o início das manifestações clínicas da infecção.

Paciente 3: As amostras de soros foram coletadas 30, 63, 93, 124, 209 e 270 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de IFI para IgM foi positiva nas amostras de soros coletadas até 93 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de ELISAc para IgM foi positiva com as amostras coletadas até 209 dias, enquanto que as reações de QmL para IgM e as reações de ELISAd, ELISAc e IC-A para IgA permaneceram positivas até a última amostra de soro testada,

coletada 270 dias após o início das manifestações clínicas. Considerando na técnica de ELISAc para IgA, níveis de anticorpos >40 UA/ml como significativos para o diagnóstico da infecção aguda, a reação foi positiva, somente, com as amostras de soros coletadas até 93 dias após o início das manifestações clínicas da infecção.

Paciente 4: As amostras de soros foram coletadas 18,38,63,98 e 258 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de ELISAc para IgA foi positiva nas amostras de soros coletadas até 63 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de IFI para IgM foi positiva com as amostras coletadas até 98 dias, enquanto que as reações de ELISAc e QmL para IgM e as reações de ELISAd e IC-A para IgA permaneceram positivas até a última amostra de soro testada, coletada 258 dias após o início das manifestações clínicas. Considerando na técnica de ELISAc para IgA, níveis de anticorpos > 40 UA/ml como significativos para o diagnóstico da infecção aguda, a reação foi positiva, somente, com as amostras de soros coletadas até 38 dias após o início das manifestações clínicas da infecção.

Paciente 5: As amostras de soros foram coletadas 30,74,287,355,460 e 617 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de ELISAd para IgA foi positiva somente com a amostra de soro coletada 30 dias após o início das manifestações clínicas. As reações de IFI e ELISAc para IgM foram positivas, respectivamente, com as amostras de soros coletadas até 74 e 460 dias, enquanto que a reação de QmL para IgM e as reações de ELISAc e IC-A para IgA permaneceram positivas até a última amostra de soro testada, coletada 617 dias após o início das manifestações clínicas. Considerando na técnica de ELISAc para IgA níveis de anticorpos > 40 UA/ml como significativos para o diagnóstico da infecção aguda, a reação foi positiva, somente, com as amostras de soros coletadas até 74 dias após o início das manifestações clínicas da infecção.

Paciente 6: As amostras de soros foram coletadas 22,85,151,210,270,327,360 e 483 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de ELISAd foi positiva nas amostras de soros coletadas até 360 dias após o início das manifestações clínicas. As reações de IFI, ELISAc e QmL para IgM e as reações de ELISAc e IC-A para IgA permaneceram positivas até a última amostra de soro testada, coletada 483 dias após o início das manifestações clínicas. Considerando na técnica de ELISAc para IgA, níveis de anticorpos > 40 UA/ml como significativos para o diagnóstico da infecção aguda, a reação foi positiva, somente, com as amostras de soros coletadas até 360 dias após o início das manifestações clínicas da infecção.

Paciente 7: As amostras de soros foram coletadas 104,172,234,298, 360 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de ELISAd para IgA foi positiva a partir da amostra de soro coletada com 172 dias e permaneceu positiva nas amostras de soros coletadas até 298 dias após o início das manifestações clínicas. As reações de IFI, ELISAc e QmL para IgM e a reação de ELISAc para IgA permaneceram positivas até a última amostra de soro testada, coletada 360 dias após o início das manifestações clínicas. Considerando na técnica de ELISAc para IgA níveis de anticorpos > 40 UA/ml como significativos para o diagnóstico da infecção aguda, a reação foi positiva, somente, com as amostras de soros coletadas até 172 dias após o início das manifestações clínicas da infecção. Este paciente apresentou título de IC-A para IgA > 1.600 na primeira amostra de soro coletada. Não foram pesquisados anticorpos IgA por IC-A nas demais amostras de soros coletadas.

Paciente 8: As amostras de soros foram coletadas 153,210,339,422 e 595 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de IFI para IgM foi positiva nas amostras de soros coletadas até 210 dias após o início das manifestações clínicas. A reação de ELISAd para IgA permaneceu positiva até a amostra de soro coletada com 339 dias, enquanto que as reações de ELISAc e QmL para IgM e a reação de ELISAc para IgA permaneceram positivas até a última amostra de soro testada, coletada 595 dias após o início das manifestações clínicas.

Considerando na técnica de ELISAc para IgA níveis de anticorpos > 40 UA/ml como significativos para o diagnóstico da infecção aguda, a reação já foi negativa na primeira amostra de soro testada, coletada 153 dias após o início das manifestações clínicas da infecção. Anticorpos IgA não foram pesquisados por IC-A nas amostras de soros coletadas.

Paciente 9: As amostras de soros foram coletadas 43,98,250,318 e 618 dias após o início das manifestações clínicas. As reações de IFI, ELISAc e QmL para IgM e as reações de ELISAd e ELISAc para IgA permaneceram positivas até a última amostra de soro testada, coletada 618 dias após o início das manifestações clínicas. Considerando na técnica de ELISAc para IgA níveis de anticorpos > 40 UA/ml como significativos para o diagnóstico da infecção aguda, a reação foi positiva, somente, com as amostras de soros coletadas até 250 dias após o início das manifestações clínicas da infecção. Este paciente apresentou título de IC-A para IgA > 1.600 na primeira amostra de soro coletada. Não foram pesquisados anticorpos IgA por IC-A nas demais amostras de soros coletadas.

Paciente 10: As amostras de soros foram coletadas 51,63,113,153,223 e 242 dias após o início das manifestações clínicas. As reações de IFI, ELISAc e QmL para IgM e as reações de ELISAd e ELISAc para IgA permaneceram positivas até a última amostra de soro testada, coletada 242 dias após o início das manifestações clínicas. Considerando na técnica de ELISAc para IgA, níveis de anticorpos > 40 UA/ml como significativos para o diagnóstico da infecção aguda, a reação foi positiva, somente, com as amostras de soros coletadas até 113 dias após o início das manifestações clínicas da infecção. Anticorpos IgA não foram pesquisados por IC-A nas amostras de soros coletadas.

Na avaliação da persistência dos anticorpos específicos foram utilizadas amostras sequenciais de soros de 10 pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda adquirida. Cumpre ressaltar que, para cada paciente incluído neste estudo, a duração da coleta das amostras de sangue bem como os intervalos de tempo entre as manifestações clínicas da infecção e a coleta das amostras de sangue foram diferentes. Em alguns casos, dado o longo intervalo de tempo entre a coleta de amostras consecutivas de sangue, não foi possível determinar a positividade ou negatividade de algumas reações sorológicas, em determinados períodos de tempo após a infecção com *T.gondii*. Nestas circunstâncias, os resultados das reações foram considerados inconclusivos. Na Tabela V, os dados são apresentados levando em consideração, somente, a interpretação dos resultados das reações sorológicas nos pacientes com amostras de sangue coletadas 6, 9, 12, 15 e 20 meses após as manifestações clínicas da infecção. Na Tabela VI, os dados são apresentados levando em consideração a projeção dos resultados sorológicos até o vigésimo mês após as manifestações clínicas da infecção, assumindo a manutenção dos resultados uma vez ocorrida a negatificação das reações.

Tabela V: Resultados da pesquisa de anticorpos específicos em diferentes intervalos de tempo após a infecção toxoplásmica.

Meses após as manifestações clínicas (número de pacientes e/ amostras de sangue coletadas)	IgM									IgA								
	IFI (≥ 32)			ELISAc R			QmL (≥ 140 UA/ml)			ELISAd (> 15 U/ml)			ELISAc (≥ 10 UA/ml)			ELISAc (> 40 UA/ml)		
	R	NR	I	R	NR	I	R	NR	I	R	NR	I	R	NR	I	R	NR	I
6 (10)	6	2	2	10	0	0	10	0	0	9	1	0	7	2	1	2	6	2
9 (7)	4	1	2	6	1	0	7	0	0	6	1	0	6	1	0	1	4	2
12 (6)	3	2	1	5	0	1	5	0	1	3	2	1	5	1	0	1	5	0
15 (4)	2	2	0	4	0	0	4	0	0	1	2	1	4	0	0	0	3	1
20 (2)	1	1	0	1	0	1	2	0	0	1	1	0	2	0	0	0	2	0

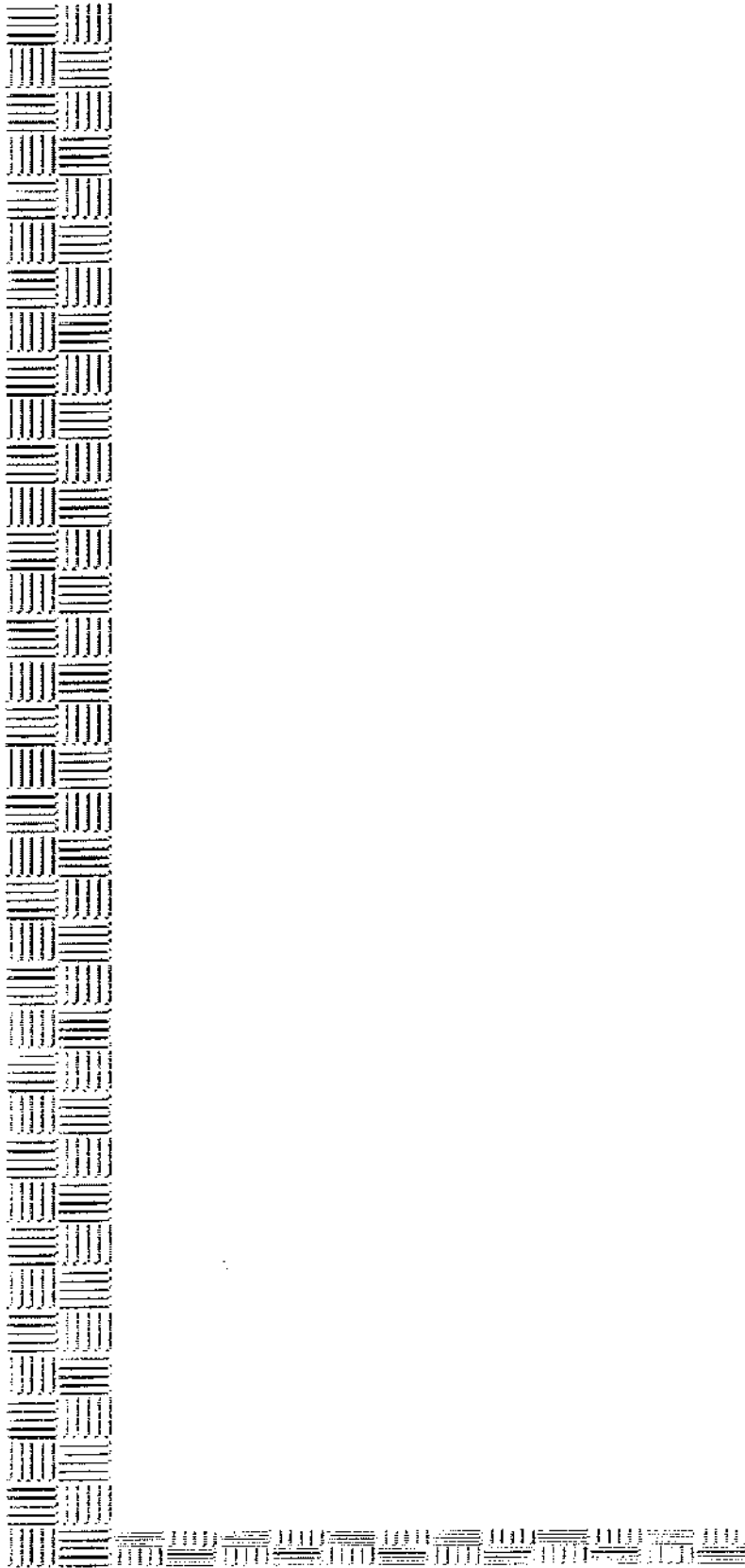
Anticorpos IgM e IgA anti *T.gondii* foram pesquisados em amostras sequenciais de soros de pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda. São apresentados os dados relativos à pesquisa de anticorpos levando em consideração o número de pacientes com amostras de sangue coletadas 6,9,12, 15 e 20 meses após as manifestações clínicas da infecção. Níveis significativos de anticorpos: IFI (IgM) ≥ 32; ELISAc (IgM) R; QmL (IgM) ≥ 140 UA/ml; ELISAd (IgA) > 15 U/ml; ELISAc (IgA) ≥ 10 UA/ml. Os resultados obtidos com a técnica de ELISAc para IgA considerando níveis de anticorpos superiores a 40 UA/ml como significativos são, também apresentados. R = Reagente; NR = Não Reagente; I = Sorologia Inconclusiva.

Tabela VI: Resultados da pesquisa de anticorpos específicos em diferentes intervalos de tempo após a infecção toxoplásmica.

Meses após as manifestações clínicas da infecção	IgM									IgA								
	IFI (≥ 32)			ELISAc R			QmL (≥ 140 UA/ml)			ELISAd (> 15 U/ml)			ELISAc (≥ 10 UA/ml)			ELISAc (> 40 UA/ml)		
	R	NR	I	R	NR	I	R	NR	I	R	NR	I	R	NR	I	R	NR	I
6	6	2	2	10	0	0	10	0	0	9	1	0	7	2	1	2	6	2
9	4	3	3	6	1	3	7	0	3	6	1	3	6	3	1	1	7	2
12	3	5	2	5	1	4	5	0	5	3	2	5	5	3	2	1	9	0
15	2	6	2	4	2	4	4	1	5	1	3	6	4	3	3	0	9	1
20	1	6	3	1	2	7	2	1	7	1	4	5	2	3	5	0	10	0

Anticorpos IgM e IgA anti-*T.gondii* foram pesquisados em amostras sequenciais de soros de pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda. São apresentados os dados relativos à pesquisa de anticorpos levando em consideração a projeção dos resultados sorológicos até o vigésimo mês após as manifestações clínicas da infecção, assumindo a manutenção dos resultados uma vez ocorrida a negatificação das reações. Níveis significativos de anticorpos: IFI (IgM) ≥ 32; ELISAc (IgM) R; QmL (IgM) ≥ 140 UA/ml; ELISAd (IgA) > 15 U/ml; ELISAc (IgA) ≥ 10 UA/ml. Os resultados obtidos com a técnica de ELISAc para IgA considerando níveis de anticorpos superiores a 40 UA/ml como significativos são, também, apresentados.

R = Reagente; NR = Não Reagente; I = Sorologia Inconclusiva



5. *Discussão*

A grande maioria dos indivíduos com toxoplasmose aguda adquirida é assintomática ou exibe sinais e sintomas não patognomônicos da infecção. Entre as técnicas laboratoriais utilizadas para a confirmação da suspeita clínica, a pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii*, até o presente momento, é aquela que oferece melhores resultados. O diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda tem, tradicionalmente, sido feito pela detecção de anticorpos específicos da classe IgM e/ou pela demonstração do aumento significativo dos títulos de anticorpos específicos da classe IgG. Entretanto, alguns fatores têm complicado a interpretação dos resultados dos testes sorológicos. Entre estes fatores, salientam-se:

1. Reações falso-positivas na pesquisa de anticorpos específicos da classe IgM

Resultados falso-positivos na pesquisa de IgM anti-*T.gondii* em amostras de soros contendo fatores reumatóides e/ou fatores anti-nucleares, tem sido observados por diversos autores. Camargo, Leser e Rocca (1972) observaram que a adição de fatores reumatóides a soros contendo anticorpos da classe IgG anti-*T.gondii* resultava em positividade da reação de IFI para a pesquisa de IgM anti-*T.gondii*. Por outro lado, o tratamento dos soros contendo fatores reumatóides com gama-globulina humana agregada pelo calor resultava em negatividade dos testes de IFI para IgM sem alteração dos títulos de anticorpos da classe IgG. Hyde, Barnett e Remington (1975), pesquisando IgM anti-*T.gondii*, por IFI, em 41 amostras de soros contendo fatores reumatóides, obtidas de pacientes sem evidências clínicas de toxoplasmose aguda, encontraram 4,8% de resultados falso-positivos. Após o tratamento dos soros falso-positivos com IgG agregada pelo calor, os autores observaram a negatividade das reações de IFI. Araujo et al (1971), também, detectaram reações falso-positivas na pesquisa de IgM anti-*T.gondii*, por IFI, em amostras de soros de pacientes com lupus eritematoso sistêmico contendo fatores anti-nucleares. Os autores observaram reações falso-positivas em 3 dos 16 pacientes estudados, com títulos de IFI para IgM variando de 10 a 40. Reações falso-positivas na pesquisa de IgM anti-*T.gondii*, também, têm sido observadas com a técnica de ELISAd. Camargo et al (1978) observaram reações de ELISAd para IgM positivas em soros

contendo fatores reumatóides. Após o tratamento dos soros com IgG humana insolubilizada, os autores observaram a negatificação das reações. Reações falso-positivas para IgM por ELISAd, devido a presença de fatores reumatóides, também, têm sido observadas por outros autores (NAOT & REMINGTON, 1980).

2. Reações falso-negativas na pesquisa de anticorpos específicos da classe IgM

O limite de sensibilidade da técnica utilizada e o efeito inibitório causado por anticorpos específicos da classe IgG, podem ocasionar reações falso-negativas na pesquisa de anticorpos específicos da classe IgM. Pyndiah et al (1979) mostraram que a reação de IFI para a detecção de anticorpos IgM anti-*T.gondii* apresenta, frequentemente, resultados falso-negativos devido a competição entre os anticorpos específicos das classes IgM e IgG. Os autores pesquisaram anticorpos anti-*T.gondii*, por IFI, em 108 soros de pacientes com manifestações clínicas sugestivas de toxoplasmose aguda. A reação de IFI realizada com soro total detectou anticorpos IgM específicos em 17 soros. Quando a fração IgM, obtida pelo fracionamento dos soros por filtração em gel, foi utilizada, 55 soros apresentaram reação de IFI positiva para anticorpos da classe IgM. Filice, Yeager e Remington (1980), mostraram, também, que altas concentrações de anticorpos IgG anti-*T.gondii* nos soros de alguns pacientes com toxoplasmose aguda adquirida ou toxoplasmose congênita, podem ter um efeito inibitório na demonstração de anticorpos específicos da classe IgM por IFI. Os autores separaram, por filtração em gel, as frações IgM e IgG de 68 soros de 47 pacientes com toxoplasmose aguda adquirida e de 13 soros de 7 crianças com toxoplasmose congênita, todos apresentando reações de IFI para IgM anti-*T.gondii* negativas. Utilizando as frações IgM, os autores conseguiram detectar anticorpos específicos em 36 (53%) soros de pacientes com toxoplasmose adquirida e em 5 (38%) soros de pacientes com toxoplasmose congênita.

Naot e Remington (1980) desenvolveram uma técnica para a pesquisa de IgM anti-*T.gondii* baseada na separação das moléculas de IgM e IgG presentes no soro, através da captura das moléculas de IgM por anticorpos anti-IgM usados no revestimento dos orifícios das placas de ELISA (ELISAc). Analisando 29 soros de pacientes com

toxoplasmose aguda adquirida, por ELISAc e IFI, os autores detectaram anticorpos IgM anti-*T.gondii* em, respectivamente, 28 (96.5%) e 17 (58.6%) casos. Após a separação das frações IgM e IgG dos soros por filtração em gel, anticorpos IgM foram detectados, por IFI, em todas as frações IgM dos soros que apresentavam reações de ELISAc reagentes. Naot, Desmonts & Remington (1981) pesquisaram anticorpos IgM anti-*T.gondii*, através de ELISAc e IFI, em 55 amostras de soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita. As técnicas de ELISAc e IFI detectaram anticorpos IgM específicos em, respectivamente, 43 (72.7%) e 14 (25,4%) soros. Os autores atribuíram o resultado obtido a maior sensibilidade da técnica de ELISAc e ao efeito inibitório dos anticorpos IgG anti-*T.gondii* nas reações de IFI.

3. Persistência de anticorpos específicos da classe IgM por longo período de tempo após a infecção com *T. gondii*

A detecção de anticorpos específicos da classe IgM por longo período de tempo, após a infecção com *T.gondii*, tem sido observada por vários autores. Remington, Miller & Brownlee (1968), pesquisaram, por IFI, anticorpos IgM anti-*T.gondii* em amostras seriadas de soros de 18 pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda adquirida. Em 4 pacientes, anticorpos IgM foram detectados em amostras de soros coletadas 23 meses após o início da infecção. Van Loon et al (1983) pesquisaram anticorpos IgM específicos, por ELISAc, em amostras seriadas de soros de 24 pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda adquirida. Após 1 ano do início das manifestações clínicas, 3 pacientes apresentavam, ainda, níveis significativos de anticorpos IgM. Brooks, McCabe & Remington (1987), analisando amostras seriadas de soros de 21 pacientes com toxoplasmose aguda adquirida, detectaram em 4 pacientes anticorpos IgM anti-*T.gondii*, por ELISAc, em amostras de soros coletadas 1 ano após a infecção. Herbrink et al (1987), pesquisaram anticorpos IgM específicos, através das técnicas de ELISAd e ELISAc, em amostras seriadas de soros de 3 pacientes com toxoplasmose aguda adquirida. Em um dos pacientes, os anticorpos IgM foram detectados, pelas duas técnicas, 1 ano após o início das manifestações clínicas. Del Bono et al (1989), estudaram a persistência dos anticorpos IgM anti-*T.gondii*, através de IFI,

ELISAc e IC-A, em amostras seriadas de soros de 38 pacientes com linfadenopatia toxoplásmica. Quatro pacientes tinham amostras de soros coletadas 18 meses após o início das manifestações clínicas. Neste período de tempo após a infecção, um paciente apresentava as três reações positivas, dois apresentavam IFI negativa com ELISAc e IC-A positivas e um paciente apresentava, somente, a reação de ELISAc positiva.

4. Persistência de altos títulos de anticorpos IgG anti-*T.gondii* por longo período de tempo após a infecção com *T.gondii*

Títulos altos de anticorpos IgG anti-*T.gondii* podem persistir por vários meses, ou mesmo anos, após a infecção toxoplásmica aguda. Deste modo, títulos altos de anticorpos específicos da classe IgG podem ser, frequentemente, encontrados na população normal. Sabin et al (1952) observaram que títulos de RSF ≥ 32.768 podem persistir, em algumas pessoas, por mais de 5 anos, após a infecção com *T.gondii*. Remington, Miller & Brownlee (1968) encontraram títulos de RSF superiores a 16.384 em amostras de soros coletadas 2 anos após a infecção toxoplásmica aguda adquirida. Camargo e Leser (1976) pesquisaram anticorpos anti-*T.gondii* em amostras seriadas de soros de pacientes com toxoplasmose aguda adquirida. Após 23 meses do início da infecção, os autores observaram que 68% dos pacientes apresentavam reação de IFI para IgG com títulos superiores a 4.000 e que 70% dos pacientes apresentavam RFC com títulos superiores a 80. Welch et al (1980), analisando amostras seriadas de soros de 27 pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda adquirida, detectaram, após 6 meses do início dos sintomas, títulos de RSF superiores a 16.000 em 30% dos pacientes. Payne, Francis & Kwantes (1984), pesquisando anticorpos anti-*T.gondii* em amostras seriadas de soros de pacientes com toxoplasmose linfadenopática, encontraram, após 1 ano do início das manifestações clínicas, títulos de RSF variando de 512 a 4.096, títulos de HI variando de 2.048 a 64.000 e títulos de aglutinação em látex variando de 64 a 2.048. Brooks, McCabe & Remington (1987), analisando amostras seriadas de soros de pacientes com linfadenopatia toxoplásmica, observaram, após 1 ano do início das manifestações clínicas, títulos de RSF superiores a 512 em 62% dos pacientes.

Como já salientado, a detecção de anticorpos IgM anti-*T.gondii* no soro tem, tradicionalmente, sido considerada um marcador sorológico da fase aguda da toxoplasmose. A avaliação da persistência dos anticorpos específicos após a infecção com *T.gondii*, realizada em nosso trabalho, mostrou que os resultados obtidos com a pesquisa de IgM devem ser interpretados com cautela. Vários autores têm considerado títulos de IFI ≥ 32 para anticorpos IgM anti-*T.gondii* como significativos para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda. Considerando tais títulos como significativos para o diagnóstico da infecção aguda, 6 meses após o início das manifestações clínicas, 6 pacientes apresentavam reações de IFI positivas e 2 reações negativas. Em dois pacientes, devido ao longo intervalo de tempo decorrido entre a coleta de algumas amostras de soros, não foi possível determinar se houve negatização das reações de IFI nos 6 meses subsequentes ao aparecimento das manifestações clínicas. Em situações nas quais o intervalo de tempo entre a coleta de amostras de sangue dificultou a interpretação dos resultados sorológicos, as reações foram referidas como inconclusivas. Nove meses após o início das manifestações clínicas, dos 7 pacientes nos quais foi possível interpretar os resultados das reações de IFI, 4 apresentavam reações positivas e 3 reações negativas. Tanto, com 12 como 15 meses após o início das manifestações clínicas, foi possível determinar a positividade ou negatividade das reações de IFI em 8 pacientes. Após 12 e 15 meses, 3 e 2 pacientes, apresentavam, respectivamente, níveis significativos de IgM por IFI (≥ 32 .) Reação de IFI com título significativo foi encontrada, ainda, na última amostra de soro testada de um dos pacientes, coletada mais de 20 meses após o início da infecção.

De acordo com Welch et al (1980), somente títulos de IFI ≥ 160 para anticorpos IgM específicos seriam bons indicadores de toxoplasmose aguda. Embora nossos resultados confirmem que títulos de IFI ≥ 160 para IgM sejam mais confiáveis para se estabelecer o diagnóstico sorológico de toxoplasmose aguda, alguns pontos merecem consideração:

1. A utilização deste critério para o diagnóstico sorológico de infecção aguda resulta em uma diminuição significativa da sensibilidade da reação de IFI. Na bateria de 54 soros de pacientes com toxoplasmose aguda utilizada no nosso trabalho, 11 soros apresentaram títulos de IFI < 160 (pacientes 8,9,15,19,24,27,28,29,30,32 e 36).

2. Os resultados das reações de IFI em amostras seriadas de soros de pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda mostraram que, em alguns casos, os títulos de IFI podem cair rapidamente para níveis não significativos (< 160) em um curto intervalo de tempo após o início das manifestações clínicas, e em outros subir vagarosamente, atingindo valores significativos (≥ 160) em um intervalo de tempo relativamente longo em relação ao início das manifestações clínicas.

3. A utilização de títulos altos de anticorpos IgM por IFI para se estabelecer o diagnóstico sorológico da fase aguda da toxoplasmose não exclui a possibilidade de títulos significativos persistirem, em alguns pacientes, por um longo período de tempo após a infecção com *T.gondii*. Em nosso trabalho, um dos pacientes incluído no estudo da persistência dos anticorpos específicos na toxoplasmose apresentou título de IFI para IgM = 256 após um ano do início das manifestações clínicas da infecção.

A medida que técnicas com sensibilidade maior do que aquela apresentada pela reação de IFI para a detecção de anticorpos IgM anti-*T.gondii* foram desenvolvidas, um número maior de pacientes com diagnóstico sorológico de infecção toxoplásmica aguda foi identificado. Entretanto, o aumento da sensibilidade das técnicas resultou na detecção de anticorpos IgM por períodos ainda maiores do que aqueles registrados por IFI. Este fato pode ser evidenciado pela comparação dos resultados obtidos com a pesquisa de anticorpos específicos da classe IgM por IFI, ELISAc e QmL nas amostras seriadas de soros dos pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda. As reações de IFI, ELISAc e QmL permaneceram positivas até a última amostra de soro testada em, respectivamente, 4, 7 e 9 pacientes.

A utilidade da pesquisa dos anticorpos IgA anti-*T.gondii* para o diagnóstico da infecção toxoplásmica aguda adquirida e da toxoplasmose congênita tem sido estudada por vários pesquisadores. Com relação ao diagnóstico da infecção congênita, há uma concordância generalizada de que a pesquisa de anticorpos específicos da classe IgA tem importância igual ou superior a pesquisa de anticorpos específicos da classe IgM (Le FICHOUX, MARTY & CHAN, 1987; DECOSTER et al, 1988; STEPICK-BIEK et al, 1990). Com relação ao diagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida, existem controvérsias.

Vários pesquisadores têm mostrado que os anticorpos anti-*T.gondii* da classe IgA são detectados com elevada frequência na fase aguda da toxoplasmose adquirida e, além disto, parecem não persistir por tempo tão longo quanto os da classe IgM, sendo, portanto, marcadores mais confiáveis da fase aguda da infecção (LE FICHOUX, MARTY & CHAN, 1987; DECOSTER et al, 1988; STEPICK-BIEK et al, 1990; BESSIERES et al, 1992). Entretanto, existem alguns trabalhos mostrando que os anticorpos específicos da classe IgM são detectados com uma frequência significativamente maior do que os anticorpos específicos da classe IgA na fase aguda da toxoplasmose adquirida e que os mesmos tendem a desaparecer antes dos anticorpos IgA no curso da infecção toxoplásmica (TURUNEN, VUORIO & LEINIKKI, 1983; PARTANEN et al, 1984).

No presente trabalho, nos concentramos sobre a utilidade da pesquisa dos anticorpos IgA anti-*T.gondii* para o diagnóstico sorológico da fase aguda da toxoplasmose adquirida. Anticorpos específicos da classe IgA foram pesquisados em um grupo de 54 pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda adquirida, através das técnicas de ELISAd, ELISAc e IC-A. Os resultados obtidos com as três técnicas foram excelentes e muito similares: 98% de sensibilidade e 97% de especificidade com a técnica de ELISAd; 100% de sensibilidade e 99% de especificidade com a técnica de ELISAc e 100% de sensibilidade e especificidade com a técnica de IC-A.

Como já ressaltado, os anticorpos específicos da classe IgG podem impedir a detecção de outras classes de anticorpos específicos. Vários autores têm mostrado que este efeito inibitório pode ser evitado pela absorção prévia dos soros com proteína A de *Staphylococcus aureus*, devido a propriedade desta proteína de interagir com a porção Fc das moléculas de IgG de várias espécies. Tal absorção pode resultar em um aumento da sensibilidade e/ou especificidade das reações (LEINIKKI et al, 1978; TURUNEN, VUORIO & LEINIKKI, 1983). A proteína G, obtida de espécies de *Streptococcus* do grupo C, interage mais eficientemente do que a proteína A com a porção Fc das moléculas de IgG. No nosso trabalho, os bons resultados obtidos com a técnica de ELISAd foram devidos a absorção prévia dos soros com proteína G. Tal absorção resultou em um aumento da especificidade e sensibilidade da técnica de ELISAd (os resultados não foram mostrados). Mesmo com o tratamento, uma reação falso-negativa (10 U/ml) e duas reações

falso-positivas foram detectadas. As reações falso-positivas foram encontradas com um soro de um paciente com rubéola (59 U/ml) e com um soro de um paciente com mononucleose infecciosa (31 U/ml). A reação falso-negativa foi detectada em uma amostra de soro coletada 3 1/2 meses após as manifestações clínicas da toxoplasmose em um dos pacientes incluído no estudo da persistência dos anticorpos específicos após a infecção com *T.gondii*. A pesquisa de anticorpos em amostras sequenciais de soros do paciente revelou aumento significativo dos níveis de IgA por ELISAd e dos títulos de IgG por IFI, quando os títulos de IFI para IgM já estavam estabilizados.

Na técnica de ELISAc para IgA, uma reação falso-positiva (24 UA/ml) foi encontrada com um soro de um paciente com mononucleose infecciosa. A técnica de ELISAc detectou níveis significativos de anticorpos IgA anti-*T.gondii* em todos os 54 pacientes com toxoplasmose aguda adquirida incluídos no nosso estudo (40 a >160 UA/ml).

A técnica de IC-A foi realizada com os soros diluídos de 1/100 a 1/1.600. Todos os soros de pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda testados apresentaram títulos de anticorpos superiores a 1.600. Por outro lado, todos os soros de pacientes com infecções heterólogas e pessoas sadias apresentaram reações negativas com os soros diluídos a 1:100.

A pesquisa de anticorpos específicos da classe IgA em amostras seriadas de soros de pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda adquirida revelou que esta classe de anticorpos, dependendo da técnica utilizada, pode, também, ser detectada, por longos períodos de tempo após a infecção com *T.gondii*. Através de ELISAd, 9 dos 10 pacientes estudados apresentavam pesquisa de IgA positiva (>15 U/ml) após 6 meses do início das manifestações clínicas. Nove meses após o início das manifestações clínicas, dos 7 pacientes nos quais foi possível interpretar as reações, 6 apresentavam reações positivas e 1 reação negativa. Com 12, 15 e 20 meses após as manifestações clínicas, foi possível interpretar as reações de ELISAd em 5, 4 e 5 pacientes. Após 12 meses, 3 pacientes apresentavam reações de ELISAd positivas. Com 15 e 20 meses, um paciente apresentava, ainda, reação de ELISAd com título significativo. Na reação de ELISAd, o cut-off da reação

foi 15 U de IgA/ml de soro. A elevação do valor do cut-off da técnica resultaria, em muitos pacientes, em diminuição do tempo de detecção de níveis significativos de anticorpos, mas, em contrapartida, diminuiria significativamente a sensibilidade da técnica, visto que vários pacientes com toxoplasmose estudados apresentaram níveis significativos de anticorpos muito próximos ao valor de 15 U/ml. Os pacientes 6,8,26,35,45 e 54, por exemplo, apresentaram reação de ELISAd com níveis de IgA variando de 17 a 20 U/ml. Convém ressaltar que, os pacientes 6,26,35,45 e 54 apresentaram reações de IFI para anticorpos IgM específicos com títulos superiores a 160.

A técnica de ELISAc para anticorpos IgA anti-*T.gondii* foi realizada utilizando-se kits comerciais da marca Sorin (Sorin Biomédica, Itália). De acordo com as instruções do kit, reações com níveis de IgA inferiores a 10 UA/ml são consideradas negativas. Reações com níveis variando de 10 a 40 UA/ml não podem ser consideradas negativas e sua significância deve ser interpretada em conjunto com os níveis de anticorpos específicos das classes IgM e IgG. Ainda, de acordo com as instruções do kit, a grande maioria dos pacientes com toxoplasmose aguda apresenta níveis de IgA superiores a 40 UA/ml. Considerando níveis de IgA ≥ 10 UA/ml como significativos, 7 dos 10 pacientes estudados apresentaram pesquisa de IgA positiva após 6 meses do início das manifestações clínicas. Após 15 meses do início das manifestações clínicas, 4 dos 7 pacientes nos quais foi possível determinar a positividade ou negatividade das reações apresentaram reações de ELISAc com níveis de IgA superiores a 10 UA/ml. Após 20 meses do início das manifestações clínicas, foi possível interpretar as reações de ELISAc em 5 pacientes. Dois destes pacientes apresentavam, ainda, reações de ELISAc com níveis de IgA > 10 UA/ml. Resultados melhores foram obtidos levando em consideração, como proposto pelas instruções do fabricante do kit de ELISAc, níveis de IgA > 40 UA/ml como indicadores de toxoplasmose aguda. Na avaliação da sensibilidade da técnica de ELISAc, 54 soros de pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda adquirida foram analisados. Com exceção de um soro apresentando ELISAc com 40 UA/ml, todos os outros soros exibiram níveis de anticorpos IgA maiores do que 40 UA/ml (64 a > 160). Cumpre ressaltar que o soro com 40 UA/ml foi coletado 5 meses após o início das manifestações clínicas da infecção. Com relação a pesquisa de IgA por ELISAc em amostras seriadas de soros de pacientes com

diagnóstico de toxoplasmose aguda, 6 meses após o início das manifestações clínicas, 2 dos 8 pacientes nos quais foi possível interpretar os resultados sorológicos, apresentaram reações com níveis de IgA > 40 UA/ml. Após 1 ano do início das manifestações clínicas, somente 1 dos 10 pacientes no quais a persistência de anticorpos foi avaliada apresentava nível de IgA por ELISAc > 40 UA/ml. Após 15 e 20 meses do início das manifestações clínicas, foi possível determinar a positividade ou negatividade das reações de ELISAc em, respectivamente, 9 e 10 pacientes. Em nenhum caso, nestes períodos de tempo após a infecção, foi observado nível de IgA > 40 UA/ml. Em termos comparativos, considerando títulos de IFI para IgM ≥ 32 como indicativos de toxoplasmose aguda, após 6 meses do início das manifestações clínicas da infecção, 6 dos 8 pacientes nos quais foi possível interpretar os resultados dos testes de IFI apresentavam reações com títulos significativos de anticorpos. Após 12 e 15 meses do início das manifestações clínicas, dos 8 nos quais foi possível interpretar os testes de IFI, 3 e 2 pacientes apresentavam, respectivamente, reações de IFI com títulos ≥ 32 . Após 20 meses do início das manifestações clínicas, 1 dos 7 pacientes nos quais foi possível interpretar os resultados dos testes de IFI apresentava, ainda, reação com nível significativo de anticorpos.

Nos soros positivos por ELISAd e ELISAc os resultados obtidos não foram diretamente comparáveis. Esta observação não é surpreendente, desde que as propriedades intrínsecas das técnicas e as preparações antigênicas utilizadas nos testes são diferentes.

A técnica de IC-A foi realizada somente em amostras seriadas de soros de 6 pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda adquirida. Em todos os casos, a pesquisa de IgA foi positiva até a última amostra de soro testada, num intervalo de tempo variando de 6 a 21 meses após o início das manifestações clínicas.

Alguns poucos estudos comparativos entre as reações de ELISAc e IC-A para o imunodiagnóstico da toxoplasmose têm mostrado que as duas reações têm a mesma especificidade (DESMONTS, NAOT & REMINGTON, 1981; DUFFY et al, 1989; PATEL et al, 1993). Entretanto, com relação à sensibilidade, os resultados são discordantes. Embora a maioria dos estudos tenha mostrado que a sensibilidade da técnica de IC-A é superior à da técnica de ELISAc (DUFFY et al, 1989; SKINNER et al 1989; PATEL et al,

1993), alguns autores tem descrito que a sensibilidade da técnica de ELISAc pode ser igual ou levemente superior a da técnica de IC-A, dependendo da bateria de soros analisada (DESMONTS, NAOT & REMINGTON, 1981). Na maioria destes estudos, os dados relativos ao intervalo de tempo decorrido entre o início da infecção toxoplásmica e a obtenção das amostras de soros analisadas são imprecisos. Nossos resultados confirmam as observações de outros autores referentes a longa persistência de detecção de anticorpos anti-*T.gondii* por IC-A (DUFFY et al, 1989; SKINNER et al, 1989). A maior persistência de detecção dos anticorpos IgA por IC-A do que por ELISAc poderia, em parte, ser responsável pelos resultados contraditórios encontrados na literatura.

Em conclusão, na avaliação da utilidade da pesquisa de uma determinada classe de anticorpos específicos (IgM ou IgA) para o diagnóstico sorológico da fase aguda de uma infecção, no caso a toxoplasmose adquirida, deve-se levar em conta não somente a sensibilidade e a especificidade da técnica empregada mas, também, a persistência de detecção da classe de anticorpos específicos pesquisada com a técnica utilizada. Levando em consideração estes aspectos, a técnica de ELISAc para IgA com cut-off de 40 UA/ml apresentou os melhores resultados para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda adquirida. Mesmo assim, um dos 10 pacientes nos quais amostras sequenciais de soros foram testadas, apresentou nível de IgA compatível com toxoplasmose aguda (> 40 UA/ml) por mais de um ano após a infecção.

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisadores têm concentrado esforços na procura de novos marcadores laboratoriais para a infecção toxoplásmica aguda. Entre os potenciais marcadores destacam-se:

1. a determinação da avidéz dos anticorpos específicos da classe IgG
2. a detecção de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) de *T.gondii* por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Em termos de imunodiagnóstico, a avidéz dos anticorpos significa a intensidade da interação dos anticorpos específicos com o antígeno multivalente correspondente. Após o estímulo antigênico, a avidéz dos anticorpos específicos aumenta com o tempo (WERBLIN

et al, 1973). Deste modo, teoricamente, a avidéz dos anticorpos nas infecções antigas tende a ser significativamente maior do que aquela encontrada nas infecções recentes. Baseado neste fato, alguns autores tem sugerido que a medida da avidéz dos anticorpos específicos da classe IgG poderia contribuir significativamente para a distinção entre infecções recentes e antigas. (HEDMAN et al, 1988; HEDMAN et al, 1989; JOYNSON PAYNE & RAWAL, 1990; WREGHITT et al, 1990; CAMARGO et al, 1991).

Para a determinação da avidéz dos anticorpos IgG anti-*T. gondii*, normalmente, tem-se utilizado uma técnica imunoenzimática. Após a interação antígeno-anticorpo, um agente dissociante, como a uréia 6M, é usado para eluir o anticorpo do antígeno imobilizado sobre a placa da reação. Como resultado, os anticorpos IgG de baixa avidéz são quase completamente dissociados, em condições onde a grande maioria dos anticorpos de alta avidéz permanece ligada ao antígeno.

Hedman et al (1989), analisaram a avidéz dos anticorpos IgG anti-*T.gondii* em amostras de soros de 5 pacientes com toxoplasmose aguda e 21 pacientes com infecção crônica. Os pacientes com infecção recente exibiram uma baixa avidéz de anticorpos IgG que persistiu por vários meses após o início dos sintomas. Em contraste, todos os indivíduos com infecção crônica apresentaram anticorpos IgG de alta avidéz. Camargo et al (1991) analisaram a avidéz dos anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros de indivíduos com perfis sorológicos compatíveis com diferentes fases da infecção toxoplásmica (CAMARGO & LESER, 1976; CAMARGO, LESER & LESER, 1976; CAMARGO et al, 1978). De acordo com os autores, os diferentes perfis foram caracterizados pelos seguintes achados sorológicos: Perfil I (toxoplasmose recente) - a) Presença de anticorpos IgM, indicada por títulos de IFI ≥ 64 , pela positividade da reação de ELISAc e por um diferencial de pelo menos 4 vezes entre os títulos de HI antes e após o tratamento dos soros com 2-mercaptoetanol (2-ME); b) Um diferencial de pelo menos 4 vezes entre altos títulos de IgG por IFI (≥ 4.096) e baixos títulos de HI; Perfil II (fase de transição) - a) Títulos de IFI para IgM < 64 e ausência de diferencial entre os títulos de HI antes e após o tratamento dos soros com 2-ME. Reação de ELISAc para IgM não reagente ou, eventualmente, reagente com valores de absorbância pouco elevados em relação ao limiar de reatividade do teste; b) Títulos igualmente elevados de IFI e HI para anticorpos IgG; Perfil III (toxoplasmose

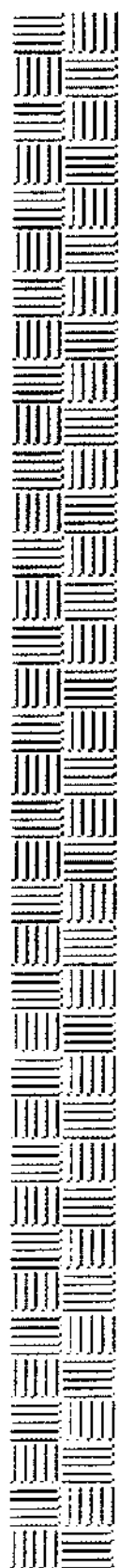
crônica) - a) negatividade de todos os testes para anticorpos IgM específicos; b) Baixos títulos de IFI para IgG (< 4.096) e do teste de HI (< 1.024). Analisando 23 soros de cada perfil sorológico, utilizando uréia 6M como agente dissociante, os autores detectaram para os perfis I, II e III, respectivamente, as seguintes médias de percentagens de queda de reatividade e desvio-padrão : $34.1\% \pm 12.1\%$, $12.1\% \pm 9.4\%$ e $3.0\% \pm 3.4\%$.

Estudos sobre a utilidade da medida da avidéz dos anticorpos IgG para a determinação de diferentes fases da infecção requerem a utilização de amostras de sangue coletadas em tempos conhecidos em relação ao início da infecção e/ou manifestações clínicas. Apesar de indicarem que a quantificação da avidéz dos anticorpos IgG pode diferenciar infecções recentes e antigas, os resultados obtidos por Camargo et al (1991) com soros de diferentes perfis sorológicos, devem ser interpretados com cautela. Trabalhos anteriores do próprio autor têm mostrado que em somente 73% dos casos de toxoplasmose estudados, a equalização dos títulos de IFI para IgG e de HI, característica do perfil de transição, ocorre até o oitavo mês de infecção. Em 8% dos pacientes, a equalização ocorre entre 8 e 18 meses após a infecção e em 20% dos pacientes ela não é observada até 23 meses após a infecção. Além disto, a utilização de títulos de IFI ≥ 64 para anticorpos IgM específicos não é um parâmetro infalível para indicar toxoplasmose aguda. Em um dos pacientes incluídos no estudo da persistência de anticorpos específicos após a infecção com *T. gondii*, um título de IFI para IgM = 64 foi encontrado na última amostra de soro testada, coletada há mais de 15 meses após as manifestações clínicas da infecção.

A detecção de sequências de DNA de *T.gondii* através da amplificação por PCR é uma das mais promissoras possibilidades para o diagnóstico da toxoplasmose. A detecção de ácidos nucleicos não é afetada por disfunções na resposta imune do hospedeiro, produz resultados mais rápidos do que aqueles obtidos por técnicas de isolamento do parasita e apresenta maior sensibilidade em relação aos procedimentos utilizados para a detecção de antígenos. A principal dificuldade registrada com o uso da técnica de PCR é a geração de resultados falso-positivos devido a contaminação das amostras durante o processamento. A técnica de PCR pode auxiliar a interpretação de casos de toxoplasmose nos quais se observa persistência de detecção dos anticorpos específicos da classe IgM. Ho-Yen et al (1992), encontraram as reações de amplificação com “primers” específicos para o gene B1 de

T.gondii, sistematicamente negativas em amostras de sangue coletadas de 9 indivíduos com resposta persistente de anticorpos IgM específicos. Por outro lado, os autores não detectaram DNA do parasita em amostras de sangue de 13 indivíduos imunocompetentes com evidências clínicas e sorológicas de infecção recente. Johnson et al (1993) mostraram que uma técnica de PCR baseada na amplificação do gene P30 de *T.gondii* apresentou maior sensibilidade que as técnicas de inoculação em camundongo e cultura de células para o isolamento do parasita. Entretanto, convém ressaltar que, casos, com PCR negativa, nos quais o parasita foi isolado de camundongos após inoculação de material contaminado, foram observados.

Os resultados do nosso trabalho enfatizam que o diagnóstico da toxoplasmose aguda adquirida, com os recursos laboratoriais atualmente disponíveis, pode não ser uma tarefa fácil. Deste modo, a descoberta de novos marcadores de infecção recente pelo *T.gondii*, sorológicos ou não, pode ser de grande utilidade.



6. Conclusões

O presente estudo foi delineado para avaliar a utilidade da pesquisa dos anticorpos IgA anti-*T.gondii* para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda adquirida. Os objetivos do nosso trabalho foram:

1. Desenvolver uma técnica de ELISAd quantitativa para a pesquisa de anticorpos IgA anti-*T.gondii*.
2. Determinar as sensibilidades e especificidades das técnicas de ELISAd, ELISAc e IC-A, com relação à pesquisa de anticorpos IgA anti-*T.gondii*, para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda adquirida
3. Avaliar, através de um estudo comparativo, a persistência dos anticorpos específicos da classe IgA, detectados por ELISAd, ELISAc e IC-A, e dos anticorpos IgM, detectados por IFI, ELISAc e QmL, após a infecção com *T.gondii*.

Os resultados do nosso trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. Os anticorpos anti-*T.gondii* da classe IgA são detectados com elevada frequência na fase aguda da toxoplasmose aguda adquirida. Na pesquisa de IgA anti-*T.gondii* em amostras de soros de 54 pacientes com toxoplasmose aguda, anticorpos específicos foram detectados em 100% dos casos com as técnicas de ELISAc e IC-A e em 98% dos casos com a técnica ELISAd. A pesquisa de IgA anti-*T.gondii* em amostras de soros de 50 pacientes com infecções heterólogas e 27 pessoas saudáveis mostrou que as especificidades das técnicas de ELISAd, ELISAc e IC-A foram, respectivamente, 97%, 99% e 100%.
2. A pesquisa de IgM anti-*T.gondii*, através das técnicas de IFI, ELISAc e QmL, em amostras sequenciais de soros de pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda confirmou as observações de outros autores referentes a longa persistência desta classe de anticorpos específicos após a infecção com o parasita. Foi observada uma relação direta entre a sensibilidade da técnica e a persistência dos anticorpos IgM.

3. A análise dos resultados da pesquisa de IgA anti-*T. gondii* em amostras seriadas de soros de pacientes com toxoplasmose aguda adquirida mostrou que as técnicas de ELISAd e IC-A para IgA, também, permaneceram positivas por um longo período de tempo após a infecção, em um número significativo de casos. Reações de ELISAd e IC-A positivas foram observadas em amostras de soros coletadas 15 ou mais meses após a infecção com *T. gondii*. Com relação a técnica de ELISAc, foi observada uma persistência de anticorpos acentuadamente menor, considerando como significativos níveis de IgA anti-*T. gondii* > 40 UA/ml. Mesmo assim, um dos pacientes estudados apresentou nível de IgA > 40 UA/ml em uma amostra de sangue coletada 12 meses após o início das manifestações clínicas da infecção. Convém ressaltar que, neste mesmo período de tempo após a infecção, três pacientes apresentaram reações de IFI com títulos significativos para anticorpos IgM anti-*T. gondii*.
4. Com relação a identificação da fase aguda da toxoplasmose adquirida através da pesquisa de anticorpos específicos, levando em consideração a frequência de detecção dos anticorpos e a persistência dos mesmos no curso de infecção, os melhores resultados foram obtidos com a técnica de ELISAc para IgA. A pesquisa de anticorpos IgM, através de IFI ou de uma técnica de maior sensibilidade tal como ELISAc ou QmL, associada a pesquisa de IgA por ELISAc poderá contribuir significativamente para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda.



7. Summary

Toxoplasmosis, an infection caused by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*, is generally asymptomatic or is associated with mild, nonspecific clinical manifestations in immunocompetent subjects.

The detection of *Toxoplasma*-specific antibodies has been considered the most valuable tool for diagnosing toxoplasmosis. Serological diagnosis of acute toxoplasmosis has traditionally been performed by detecting specific IgM antibodies and/or by demonstrating a significant increase in specific IgG antibody levels. However, the presence of high anti-*Toxoplasma* IgG antibody titers in a significant number of normal subjects and the persistence, in some persons, of specific IgM antibodies for several months or even years following the acute infection have complicated the interpretation of serological test results when toxoplasmosis is suspected.

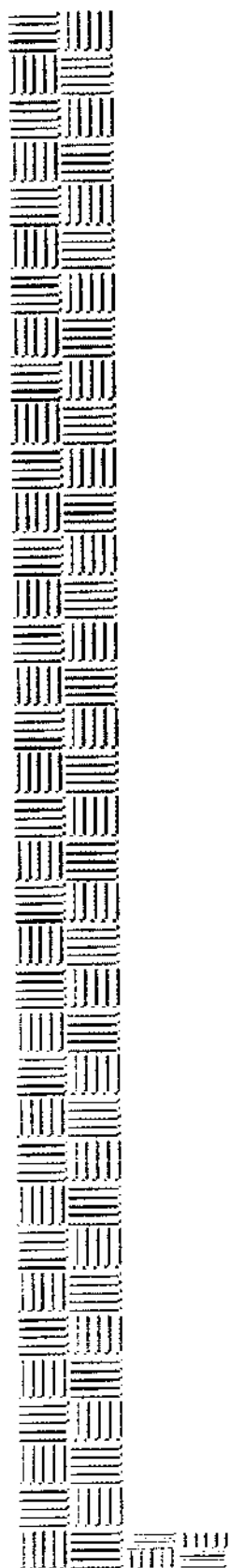
The present study was designed to evaluate the usefulness of detecting *Toxoplasma* - specific IgA antibodies for the diagnosis of acute acquired toxoplasmosis.

The sensitivities and specificities of the direct ELISA (dELISA), immunocapture ELISA (cELISA) and immunocapture-agglutination assay (IC-A) for detecting *Toxoplasma*-specific IgA antibodies were determined by analysing the following groups of sera: 54 serum samples from patients with acute acquired toxoplasmosis, 50 serum samples from patients with heterologous infections and 27 serum samples from healthy controls. The performances of the three techniques were excellent and very similar: 98% sensitivity and 97% specificity for the dELISA, 100% sensitivity and 99% specificity for the cELISA and 100% sensitivity and specificity for the IC-A.

In a comparative study, the persistence of *Toxoplasma*- specific IgA antibodies, detected by dELISA, cELISA and IC-A, and of *Toxoplasma*-specific IgM antibodies, detected by indirect immunofluorescence (IFI), cELISA and an enzyme-mediated chemiluminescent assay (QmL), were assessed using sequential serum samples obtained from ten patients at various intervals after the beginning of the clinical manifestations of toxoplasmosis. Our results from screening for *Toxoplasma* - specific

IgM antibodies confirmed the observations of others regarding the sustained persistence of such antibodies after infection with the parasite. A longer persistence of IgM was observed using the cELISA and QmL in a significant number of cases. The dELISA and IC-A techniques also detected specific IgA antibodies for a long period after the infection with *T.gondii*. The best results for IgA were obtained with the cELISA for which values >40 AU/ml represented significant antibody levels.

We conclude that the screening for IgA antibodies by cELISA coupled with the screening for IgM antibodies by IFI or a technique with a higher sensitivity could significantly improve the serological diagnosis of acute acquired toxoplasmosis.



8. Referências bibliográficas

- 1.ABBAS, A.M.A. Comparative study of methods used for the isolation of *Toxoplasma gondii*. **Bull. WHO** 36:344-6, 1967.
- 2.AMBROISE-THOMAS, P.; SIMON, J. & BAYARD, M. Indirect hemagglutination using whole mixed antigen for checking toxoplasmosis immunity and for serodiagnosis of human toxoplasmosis compared to immunofluorescence. **Biomedicine** 29:245-8, 1978.
- 3.ARAÚJO, F.G.; BARNETT, E.V.; GENTRY, L.O. & REMINGTON, J.S. False-positive anti-toxoplasma-fluorescent antibody tests in patients with antinuclear antibodies. **Appl.Microbiol.** 22:270-5, 1971.
- 4.ARAUJO, F.G.; HANDMAN, E. & REMINGTON, J.S. Use of monoclonal antibodies to detect antigens of *T. gondii* in serum and other body fluids. **Infect Immun** 30:12-6, 1980.
- 5.ARAUJO, F.G. & REMINGTON, J.S. Antigenemia in recently acquired acute toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.** 141: 144-50, 1980.
- 6.ARDOIN, P.; COUZINEAU, P. & BAUFINE-DUCROCQ, H. Sur l'utilisation du Sarcome T.G. 180 pour l'obtention d'une suspension riche in *T. gondii* extracellulaires. **C. R. Soc. Biol.** 161: 117-9, 1967.
- 7.BEN RACHID, M.S.; FERRERO, G. & DESMONTS, G. Résultats de la reaction d'hemagglutination dans la toxoplasmose humaine. **Arch. Inst. Pasteur Tunis** 44: 391-400, 1967.
- 8.BESSIERES, M.H.; ROQUES, C.; BERREBI, A.; BARRE, V.; CAZAUX, M.; SÉGUELA, J.P. IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. **J. Clin. Pathol.** 45: 605-8, 1992.
- 9.BROOKS, R.G.; MCCABE, R.E. & REMINGTON, J.S. Role of serology in the diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. **Rev. Infect. Dis.** 9: 1055-62, 1987.

10. CAMARGO, M.E. Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em 1000 soros humanos. Comportamento anômalo de alguns soros. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 24: 1-26, 1964.
11. CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W.; MINEO, J. R.; TAKIGUTI, C. K. & NAKAHARA, O. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infect. Immun.** 21: 55-8, 1978.
12. CAMARGO, M. E. & LESER, P. G. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II Evolutive study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence tests. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 18: 227-38, 1976.
13. CAMARGO, M. E.; LESER, P. G. & LESER, W. S. P. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. I- A comparative study of hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence tests in 3752 serum samples. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 18: 215-26, 1976.
14. CAMARGO, M. E.; LESER, P. G. & ROCCA, A. Rheumatoid factor as cause for false-positive IgM anti-Toxoplasma-fluorescent tests. A technique for specific results. **Rev. Inst. Med. Trop São Paulo** 14: 310-3, 1972.
15. CAMARGO, M. E.; da SILVA, S. M.; LESER, P. G. & GRANATO, C. H. Aidez de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 33: 213-8, 1991.
16. CHANG, C.; STULBERG, C.; BOLLINGER, R. O.; WALKER, R. & BROUGH, A. J. Isolation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. **J Pediatr** 81: 790-7, 1972.

17. CHANTLER, S.E.; DEVRIES, E.; ALLEN, P. R. & HUEN, B. A. L. A rapid immunofluorescent procedure for the detection of specific IgG and IgM antibody in sera using *Staphylococcus aureus* and latex-IgG as absorbents. **J. Immunol. Methods** 13:367-80, 1976.
18. COUVREUR, J. & DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Maclead, C. Ed. **Parasitic infections of pregnancy and the newborn**. Oxford University Press, New York, 1988, pp 112-142.
19. DECOSTER, A.; DARCY, F.; CARON, A.; CAPRON, A. IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. **Lancet** 2: 1104-7, 1988.
20. DECOSTER, A.; SLIZEWICZ, B.; SIMON, J.; BAZIN, C.; DARCY, F.; VITTU, G.; BOULANGER, C.; CHAMPEAU, Y.; DEMORY, J.L.; DUHAMEL, M. & CAPRON, A. Plateia-Toxo IgA, a new kit for early diagnosis of congenital toxoplasmosis by detection of anti-P30 immunoglobulin A antibodies. **J. Clin. Microbiol.** 29: 2291-5, 1991.
21. DEL BONO, V.; CANESSA, A.; BRUZZI, P.; FIORELLI, M. A.; TERRAGNA, A. Significance of specific immunoglobulin M in the cronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. **J. Clin. Microbiol.** 27: 2133-5, 1989.
22. DEROUIN, F.; MAZERON, M. C. & GARIN, Y. J. F. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.** 25:1597-600, 1987.
23. DESMONTS, G. & COUVREUR, J. Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. **Bull. N. Y. Acad. Med.** 50: 146-59, 1974a.
24. DESMONTS, G. & COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis: A prospective study of 378 pregnancies. **N. Engl. J. Med.** 290: 1110-6, 1974b.

- 25.DESMONTS, G. & COUVREUR, J. L'isolament du parasite dans la toxoplasmose congénitale: Intéret pratique et théorique. **Arch. Franç. Péd.** 31:157-66, 1974c.
- 26.DESMONTS, G.; NAOT, Y. & REMINGTON, J.S. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: Diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. **J. Clin. Microbiol.** 14:486-91, 1981.
- 27.DESMONTS, G. & REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. **J. Clin. Microbiol.** 11: 562-8, 1980.
- 28.DORFMAN, R.F. & REMINGTON, J. S. Value of lymph-node biopsy in the diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. **N. Engl. J. Med.** 289: 878-81, 1973.
- 29.DUFFY, K. T.; WARTON, P.J.; JOHNSON, J. D.; NEW, L. & HOLLIMAN, R. E. Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting toxoplasma specific IgM. **J. Clin. Pathol.** 42: 1291-5, 1989.
- 30.FELDMAN, H. A. Maxwell Finland lecture: To establish a fact. **J. Infect. Dis.** 141: 525-9, 1980.
- 31.FILICE, G. A.; YEAGER, A. S. & REMINGTON, J. S. Diagnostic significance of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* detected after separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G antibodies. **J. Clin. Microbiol.** 12: 336-42, 1980.
- 32.FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis: Parasite life cycle, pathology and immunology. In: Hamond, D.M., Ed. **The Coccidia**. University Park Press, Baltimore, 1973, pp 343-410.
- 33.FRENKEL, J. K. & PIEKARSKI, G. The demonstration of *Toxoplasma* and other organisms by immunofluorescence: a pitfall. **J. Infect. Dis.** 138: 265-6, 1978.

34. FULTON, J. D. & TURK, J. K. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. **Lancet** 2: 1068-9, 1959.
35. GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. Methods in Immunology: A laboratory text for instruction and research. **Dissociation from insoluble antigen adsorbents (affinity chromatography)**. W.A. Benjamin Inc., Massachusetts, 1977, pp 245-55.
36. HANCOCK, K.; TSANG, V.C.W. Development and optimization of the FAST-ELISA for detecting antibodies to *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol. Methods** 92: 167-76, 1986.
37. HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPÄLÄ, I. & MÄKELÄ, O. Recent rubella infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. Clin. Immunol.** 8: 214-21, 1988.
38. HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPÄLÄ, I. & MÄKELÄ, O. Recent primary toxoplasma infection indicated by low avidity of specific IgG. **J. Infect. Dis.** 159: 736-40, 1989.
39. HERBRINK, P.; van LOON, A. M.; ROTMANS, J. P.; van KNAPEN, F. & van DIJK, W. C. Interlaboratory evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay, antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting detection of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.** 25: 100-5, 1987.
40. HOLLIMAN, R. E. Toxoplasmosis and the acquired immune deficiency syndrome. **J. Infect.** 16: 121-8, 1988.
41. HOROWITZ, S. L.; BENTSON, J. R.; DAVOS, I.; PRESSMAN, B. & GOTTLIEB, M. S. CNS toxoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome. **Arch. Neurol.** 40: 649-52, 1983.

42. HO-YEN, D. O.; JOSS, A. W. L.; BALFOUR, A. H.; SMYTH, E. T. M.; BAIRD, D. & CHATTERTON, J. M. W. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. **J. Clin. Pathol.** **45**: 910-13, 1992.
43. HYDE, B.; BARNETT, E. V. & REMINGTON, J. S. Method for differentiation of non-specific from specific toxoplasma IgM immunofluorescent antibodies in patients with rheumatoid factor. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **148**: 1184-8, 1975.
44. JACOBS, L. & LUNDE, M. A hemagglutination test for toxoplasmosis. **J. Parasitol.** **43**: 308-314, 1957.
45. JOHNSON, J. D.; BUTCHER, P. D.; SAVVA, D. & HOLLIMAN, R. E. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.** **26**: 147-58, 1993.
46. JONES, T. C.; KEAN, B. H. & KIMBALL, A. C. Acquired toxoplasmosis. **NY State J. Med.** **69**: 2237-42, 1969.
47. JOYNSON, D. H. M.; PAYNE, R. A.; RAWAL, B. K. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. **J. Clin. Pathol.** **43**: 1032-3, 1990.
48. LE FICHOUX, Y.; MARTY, P. & CHAN, H. Les IgA sériques spécifiques dans le diagnostic de la toxoplasmose. **Ann. Pédiatr. (Paris)** **34**: 375-9, 1987.
49. LEINIKKI, P. O.; SHEKARCHI, I.; DORSETT, P. & SEVER, J. L. Determination of virus-specific IgM antibodies by using ELISA. Elimination of false-positive results with protein-A-Sepharose adsorption and subsequent IgM antibody assay. **J. Lab. Clin. Med.** **92**: 849-57, 1978.
50. LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**: 265-75, 1951.

51. LUFT, B. J. & REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis of the central nervous system. In: Remington, J.S. & Swartz, M. N. Ed. **Curr. Clin. Top. Infect. Dis.** New York, 1985, pp 315-58.
52. LUFT, B. J. & REMINGTON, J. S. Aids commentary. Toxoplasmic encephalitis. **J. Infect. Dis.** **157**: 1-6, 1988.
53. McCABE, R. E.; BROOKS, R. G.; DORFMAN, R. F. & REMINGTON, J. S. Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. **Rev. Infect. Dis.** **6**: 754-74, 1987.
54. MIETTINEN, M. & FRANSSILA, K. Malignant lymphoma simulating lymphonode toxoplasmosis. **Histopathology** **6**: 129-40, 1982.
55. MICHELSON, J. B.; SHIELDS, J. A.; MCDONALD, P. R.; MANKO, M. A.; ABRAHAN, A. A. & FEDERMAN, J. L. Retinitis secondary to acquired systemic toxoplasmosis with isolation of the parasite. **Am. J. Ophthalmol.** **86**: 548-52, 1978.
56. NAOT, Y. & REMINGTON, J. S. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: Use for diagnosis of acute-acquired toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.** **142**: 757-66, 1980.
57. NAOT, Y.; DESMONTS, G. & REMINGTON, J. S. IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. **J. Pediatr.** **98**: 32-6, 1981.
58. PARTANEN, P.; TURUNEN, H. J.; PAASIVUO, R. A. & LEINIKKI, P. O. Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M and A antibodies at different stages of infection. **J. Clin. Microbiol.** **20**: 133-5, 1984.

59. PATEL, B.; YOUNG, Y.; DUFFY, K.; TANNER, R. P.; JOHNSON, J. & HOLLIMAN, R. E. Immunoglobulin-A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. **J. Med. Microbiol.** **38**: 286-92, 1993.
60. PAYNE, R. A.; FRANCIS, J. M. & KWANTES, W. Comparison of a latex agglutination test with other serological tests for the measurement of antibodies to *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Pathol.** **37**: 1293-7, 1984.
61. PUJOL, M.; MOREL, C. & MALBRUNY, B. Intérêt de la recherche des IgA dans le diagnostic de la toxoplasmose. **Path. Biol.** **37**: 893-6, 1989.
62. PYNDIAH, N.; KRECH, U.; PRICE, P. & WILHELM, J. Simplified chromatography separation of immunoglobulin M from G and its application to toxoplasma indirect immunofluorescence. **J. Clin. Microbiol.** **9**: 170-4, 1979.
63. RAFATY, F. M. Cervical adenopathy secondary to toxoplasmosis. **Arch. Otolaryngol.** **103**: 547-9, 1977.
64. REKVIG, O. P. & HANNESTAD, K. The specificity of human autoantibodies that react with both cell nuclei and plasma membranes: The nuclear antigen is present on core mononucleosomes. **J. Immunol.** **123**: 2673-81, 1979.
65. REMINGTON, J. S. & DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S. & Klein, J. O. Eds. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. WB Saunders Company. Philadelphia, 1990, pp 89-195.
66. REMINGTON, J. S.; MILLER, M. J. & BROWNLEE, I. IgM antibodies in acute toxoplasmosis. II. Prevalence and significance in acquired cases. **J. Lab. Clin. Med.** **71**: 855-66, 1968.
67. RUBIN, R. L. & CARR, R. I. Anti-DNA activity of IgG F(ab')₂ from normal human serum. **J. Immunol.** **122**: 1604-7, 1979.

- 68.SAARI, M.; VOURRE, I.; NEIMINEN, H. & RÄISANEN, S. Acquired toxoplasmic chorioretinitis. **Arch. Ophthalmol.** **94**: 1485-8, 1976.
- 69.SABIN, A. B.; EICHENWALD, H.; FELDMAN, H. A. & JACOBS, L. Present status of clinical manifestations of toxoplasmosis in man. **JAMA** **150**: 1063-9, 1952.
- 70.SABIN, A. B. & FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicator of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). **Science** **108**: 660-3, 1948.
- 71.SENET, J. P.; ROBERT, R. & MAURAS, G. Diagnostic de la toxoplasmose par hemagglutination indirecte. II. Intérêt de la fixation de l'antigène mixte en présence de glutaraldéhyde dans le diagnostic précoce de l'affection. **Biomedicine** **25**: 212-4, 1976.
- 72.SKINNER, L. J.; CHATTERTON, J. M.; JOSS, A. W.; MOIR, I. L. & HO-YEN, D. O. The use of an IgM immunosorbent agglutination assay to diagnose congenital toxoplasmosis. **J. Med. Microbiol.** **28**: 125-8, 1989.
- 73.STEPICK-BIEK, P.; THULLIEZ, P.; ARAUJO, F. G. & REMINGTON, J. S. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquires toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.** **162**: 270-3, 1990.
- 74.TURUNEN, H.; VUORIO, K. A. & LEINIKKI, P. O. Determination of IgG, IgM and IgA antibody responses in human toxoplasmosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Scand. J. Infect. Dis.** **15**: 307-11, 1983.
- 75.VAN KNAPEN, F. & PANGGABEAN, S. O. Detection of circulating antigen during acute infections with *Toxoplasma gondii* by enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol** **6**:545-547, 1977.

76. VAN LOON, A. M.; van der LOGT, J. T. M.; HEESSEN, F. W. A. & van der VEEN, J. Enzyme-linked immunosorbent assay that uses labeled antigen for detection of immunoglobulin M and A antibodies in toxoplasmosis: comparison with indirect immunofluorescence and double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.** 17: 997-1004, 1983.
77. VISCHER, T. L.; BERNHEIM, C. R. & ENGELBRECHT, E. Two cases of hepatitis due to *T. gondii*. **Lancet** 2:919-21, 1967.
78. VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A.; FLECK, D. G.; PERKINS, M. & OLADEHIN, B. A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. **J. Clin. Pathol.** 29: 150-3, 1976.
79. WALTON, B. C.; BENCHOFF, B. M. & BROOKS, W. H. Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detecting antibodies to *Toxoplasma gondii*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 15: 149-52, 1966.
80. WARREN, J. & SABIN, A. B. Complement fixation in toxoplasmic infection. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 51: 11-4, 1942.
81. WELCH, P. C.; MASUR, H.; JONES, T. C. & REMINGTON, J. S. Serologic diagnosis of acute lymphadenopathic toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.** 142: 256-64, 1980.
82. WERBLIN, T. P.; KIM, Y. T.; QUAGLIATA, F. & SISKIND, G. W. Studies on the control of antibody synthesis. III. Changes in heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. **Immunology** 24: 477-92, 1973.
83. WILSON, C.B.; REMINGTON, J. S.; STAGNO, S.; & REYNOLDS, D. W. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. **Pediatrics** 66: 764-74, 1980.

84. WREGHITT, T. G.; GRAY, J. J.; ALOYSIUS, S.; CONTRERAS, M. & BARBARA, J. A. J. Antibody avidity test for recent infection with hepatitis C virus. **Lancet** 335: 789, 1990.
85. YOLKEN, R. H. & STOPA, P. J. Analysis of non-specific reactions in enzyme-linked immunosorbent assay testing for human rotavirus. **J. Clin. Microbiol.** 10: 703-7, 1979.
86. YODEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer** 3: 32-5, 1950.