

ESTUDO DA REPRODUTIBILIDADE DA REAÇÃO DE  
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A PESQUISA DE  
ANTICORPOS SÉRICOS PARA *TOXOPLASMA GONDII*,  
UTILIZANDO-SE QUATRO CEPAS DIFERENTES DO PARASITO  
COMO ANTÍGENO

MINA FISZMAN\*  
SERGIO GOMES COUTINHO\*

*Utilizaram-se 4 diferentes cepas de Toxoplasma gondii como antígeno para reação de imunofluorescência indireta (RIFI), para verificar se há influência da cepa nos títulos de anticorpos séricos observados. As 4 cepas foram isoladas de casos humanos. Uma das cepas (cepa "C") foi isolada de um caso de toxoplasmose congênita e as outras 3 isoladas de casos de toxoplasmose linfoglandular (cepas "I", "S" e "E").*

*Dos 72 soros humanos examinados pela RIFI, foi observado que 13 deles eram não reatores à diluição 1:16 ao utilizar-se cada uma das 4 cepas como antígeno.*

*Em apenas 5 soros encontrou-se concordância dos títulos de anticorpos ao serem utilizadas as 4 cepas como antígeno, sendo um deles concordante à diluição 1:16 e 4 deles à diluição 1:64.*

*Nos outros 54 soros examinados, observaram-se títulos diferentes em uma a três diluições ao quádruplo, conforme a cepa utilizada como antígeno.*

*Pela aplicação de testes estatísticos, verificou-se que em relação à cepa "C" essas diferenças eram significantes, enquanto que ao se comparar os resultados encontrados com as cepas "I", "S" e "E", as diferenças não se mostraram significantes em um nível de 5%.*

*A tendência a títulos de anticorpos séricos mais elevados ao utilizar-se a cepa "C" pode estar relacionada a diferenças antigênicas. Para uma boa reprodutibilidade dos resultados pela RIFI, torna-se necessária a padronização não apenas das técnicas da reação, equipamentos ópticos e reagentes, mas também do antígeno empregado.*

A infecção humana pelo *Toxoplasma gondii* determina no soro o aparecimento de anticorpos nas várias classes de imunoglobulinas.

---

\*Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Endereço atual: Instituto Oswaldo Cruz, Caixa Postal 926, 20000 – Rio de Janeiro, Brasil.

Recebido para publicação em 28 de outubro de 1977.

Dentre os métodos laboratoriais para a pesquisa destes anticorpos, encontram-se as reações de fixação de complemento, de hemaglutinação, reação de imunofluorescência, reação do corante, além de outras.

De acordo com inúmeros autores, entre os quais Camargo, 1964, Coutinho e cols., 1970 a reação do corante de Sabin-Feldman, vem sendo considerada método padrão para pesquisa e titulação de anticorpos para *Toxoplasma gondii*. Entretanto seu emprego é limitado pela dificuldade de execução da prova, o que justifica o desenvolvimento de novas técnicas para sua substituição com vantagens.

A prova de fixação de complemento mostra-se menos sensível que a reação de Sabin-Feldman, o que vários autores justificam pela variedade de anticorpos revelados nas duas técnicas.

Segundo Walton, 1971, a reação de hemaglutinação mostra também sensibilidade menor que a reação de Sabin-Feldman, sendo entretanto de execução mais simples que a reação do corante. No entanto, além de resultados discrepantes, a reação de hemaglutinação, assim como a reação de fixação de complemento, exigem a obtenção de grandes quantidades de toxoplasma como antígeno.

Karim & Ludlam, 1975, relacionam diversos métodos para a pesquisa de anticorpos em toxoplasmose glandular, demonstrando a necessidade de muitas vezes utilizar-se mais de um método sorológico para uma melhor avaliação da evolução da doença.

Segundo Camargo, Leser & Leser, 1976, Guimarães e cols., 1968, Coutinho e cols., 1970 e outros, a reação de imunofluorescência tornou-se um dos métodos mais práticos para o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose, pela sensibilidade e especificidade de resultados, além da execução bastante simples e resultados comparáveis à reação do corante.

A importância da RIFI na toxoplasmose torna-se ainda mais evidente por se constituir no melhor método para evidenciação de anticorpos específicos na classe IgM das imunoglobulinas. Esta técnica a partir dos trabalhos de Remington, 1969, vem sendo considerada de importância no diagnóstico da fase aguda da toxoplasmose, principalmente quando associada a outros métodos diagnósticos.

Tem sido, entretanto, relatado o encontro de títulos diferentes de anticorpos em um mesmo soro, quando submetido mais de uma vez à pesquisa de anticorpos pela mesma técnica, em um único laboratório ou em laboratórios diferentes. Este fato é observado não apenas na reação de imunofluorescência, mas também em outras reações para a pesquisa de anticorpos séricos. Essas divergências são justificadas por diferença de equipamentos, reagentes de diversas partidas e mesmo pela atividade dos antígenos utilizados.

No presente trabalho, procura-se verificar a importância da utilização de diferentes cepas do parasita como antígeno para a reação de imunofluorescência. Para isso, manteve-se exatamente a mesma técnica, equipamento óptico e os reagentes, variando-se apenas a origem do antígeno.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Cepas utilizadas* — Utilizaram-se 4 cepas de *Toxoplasma gondii* denominadas Congênita (C), Imaculada (I), Sonia (S) e Elza (E). Os antígenos foram obtidos a partir de exudato peritoneal de camundongos infectados de 2 a 3 dias. Foram estudados 72 soros escolhidos ao acaso para a pesquisa de anticorpos para toxoplasma por imunofluorescência indireta. Não se tomou em consideração o sexo, a idade, ou a história clínica dos pacientes.

As cepas "I", "S", "E" foram isoladas por Coutinho & Mendonça, 1974, de casos de toxoplasmose linfoglandular e a cepa "C" de um caso de toxoplasmose congênita. Essas cepas vêm sendo mantidas em laboratório por passagens sucessivas em camundongos albinos. A cepa "C" foi isolada há cerca de 10 anos enquanto que a "S" há 4 anos e a "I" e "E" há 3 anos.

*Soros estudados* – Para a reação de imunofluorescência, usou-se a técnica já utilizada anteriormente por Coutinho e cols., 1970, com diluições do soro à razão 4 a partir de 1:16 até 1:4096. Estas diluições dos soros foram colocadas para reagir frente a cada um dos quatro antígenos, mantendo-se idêntico o restante da técnica da reação.

*Técnica da reação* – Utilizou-se um conjugado fluorescente "HYLAND", anti-globulina humana, marcado com isotiocianato de fluoresceína e isento de anticorpos para toxoplasma. Após sua reconstituição e titulação, foi dividido em alíquotas e estocado à  $-20^{\circ}\text{C}$ . As diluições foram realizadas em tampão fosfato pH 7,2  $-0,15\text{M}$ .

Para leitura, foi utilizado microscópio WILD, equipado com condensador de campo escuro, com fonte luminosa HBO-200 Osram, e filtro excitador BG-12.

No momento da leitura, tomava-se cuidado para que não se soubesse a correspondência do soro com o antígeno, sendo que os resultados só foram comparados no final do trabalho.

Considerou-se como título de anticorpos a última diluição em que a fluorescência envolvia todo o toxoplasma.

Nas reações negativas, os toxoplasmas não apresentavam fluorescência, ou esta ficava localizada apenas em uma das extremidades do parasito (coloração polar).

## RESULTADOS

Nos 72 soros examinados pela reação de imunofluorescência indireta, foi observado que 13 deles eram não reatores à diluição 1:16 ao utilizar-se cada uma das 4 cepas como antígeno. Dos 5 soros que apresentaram títulos de anticorpos concordantes ao serem utilizadas as 4 cepas como antígeno, apenas um deles foi concordante à diluição 1:16 e 4 deles à diluição 1:64. Na tabela I, verifica-se a distribuição observada quanto aos títulos dos diferentes soros, utilizando-se cada uma das 4 cepas como antígeno. Nesta tabela nota-se uma ocorrência de 17 soros (23,61%) não reagentes à diluição 1:16 para a cepa "C", enquanto que para as cepas "S" e "E", verificou-se em ambas a ocorrência de 24 soros não reagentes, o que corresponde a 33,33% de cada uma delas. Com relação à cepa "I", verificou-se 20 soros não reagentes (27,78%).

Quanto à diluição 1:4096, observou-se maior frequência quando utilizou-se a cepa "C" (7 soros – 9,72%) enquanto que a menor frequência desta diluição ocorreu quando utilizou-se a cepa "S" como antígeno (1 soro – 1,39%).

Na tabela II, encontra-se a comparação duas a duas das 4 cepas utilizadas como antígeno em relação aos títulos "concordantes e não concordantes", dos soros examinados.

Na tabela III, encontra-se a comparação duas a duas das cepas utilizadas como antígeno em relação aos títulos "não concordantes", tanto em uma diluição ao quádruplo como em 2 a 3 diluições ao quádruplo. Por esta tabela, verifica-se ao comparar-se a cepa "C" com as demais, em relação ao total de soros com títulos não concordantes, que em maior número de vezes, os títulos foram mais elevados com a cepa "C" do que com

TABELA I

Títulos de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em 72 soros humanos, pela imunofluorescência indireta, utilizando-se como antígeno 4 cepas diferentes do parasito.

Recíproca dos títulos da R.I.F.I.	Nº de soros e % dos títulos observados segundo a cepa usada							
	Cepa "C"		Cepa "I"		"Cepa "S"		Cepa "E"	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
NR	17	23,61	20	27,78	24	33,33	24	33,33
16	12	16,67	16	22,22	11	15,28	11	15,28
64	24	33,33	20	27,78	19	26,38	22	30,58
256	9	12,50	10	13,88	13	18,06	9	12,50
1024	3	4,17	3	4,17	4	5,56	2	2,75
4096	7	9,72	3	4,17	1	1,39	4	5,56
TOTAL	72	100	72	100	72	100	72	100

R.I.F.I. = Reação de imunofluorescência indireta

C = Congênita                      S = Sonia

I = Imaculada                      E = Elza

NR = Soro não reagente à diluição de 1 : 16

TABELA II

Comparação duas a duas de 4 cepas de *Toxoplasma gondii* utilizadas como antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. Número e percentagem dos soros com títulos "concordantes" e "não concordantes" em um total de 72 soros examinados.

Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> comparadas	Soros com títulos concordantes		Soros com títulos não concordantes	
	Nº	%	Nº	%
C X I	36	50,0	36	50,0
C X S	39	54,2	33	45,8
C X E	43	59,8	29	40,2
I X S	45	62,5	27	37,5
I X E	36	50,0	36	50,0
S X E	43	59,8	29	40,2

100% = 72 soros examinados

C = Congênita                      S = Sonia

I = Imaculada                      E = Elza

TABELA III

Comparação duas a duas, de 4 cepas de *Toxoplasma gondii* utilizadas como antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. Número e percentagem apenas dos 54 soros com títulos "não concordantes", em um total de 72 soros examinados.

Cepas comparadas Título observado com a 1ª cepa > 2ª cepa	Soros com títulos não concordantes em uma diluição ao quádruplo		Soros com títulos não concordantes em 2 ou 3 diluições ao quádruplo		Total de soros com títulos não concordantes	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
C > I	22	30,55	4	5,55	26	36,12
I > C	9	12,50	1	1,38	10	13,88
C > S	16	22,22	8	11,11	24	33,33
S > C	9	12,50	0	0	9	12,50
C > E	16	22,22	7	9,58	23	31,94
E > C	5	6,94	1	1,38	6	8,33
I > S	11	15,27	3	4,16	14	19,44
S > I	13	18,05	0	0	13	18,06
I > E	15	20,83	4	5,55	19	26,38
E > I	14	19,44	3	4,16	17	23,62
S > E	11	15,27	4	5,55	15	20,83
E > S	9	12,50	5	6,94	14	19,44

100% = 72 soros examinados

> = maior que

C = Congênita

I = Imaculada

S = Sonia

E = Elza

cada uma das outras três. Esses títulos mais elevados ocorreram tanto em uma, como também em duas e três diluições ao quádruplo.

Por outro lado, ao comparar-se as cepas "I", "S" e "E" entre elas, verificou-se que os resultados foram semelhantes, com pequenas diferenças quanto ao número de soros com títulos não concordantes.

Para verificar se estes resultados eram significantes foram utilizados os testes estatísticos binomial de probabilidade exata e o de Friedman, 1975, para amostras pareadas.

Pela aplicação do teste binomial (tabela IV), comparando-se duas a duas as 4 cepas utilizadas, verificou-se que as diferenças de títulos observadas quando utilizou-se a cepa "C" como antígeno, eram significantes, já que o valor de "p" foi menor que 0,05. Em relação à comparação entre as cepas "I", "S" e "E" entre elas, o valor de "p" observado foi sempre maior que 0,05, mostrando diferenças não significantes no nível de 5%.

TABELA IV

Resultados da aplicação do teste binomial de probabilidade exata, ao se comparar duas a duas, as 4 cepas de *Toxoplasma gondii* estudadas, quanto aos títulos de anticorpos séricos "não concordantes" observados pela imunofluorescência indireta.

Cepas comparadas 1ª cepa X 2ª cepa	Nº de soros com títulos na 1ª cepa diferente da 2ª cepa	Nº de soros com títulos na 1ª cepa superior à 2ª cepa	"p" encontrado menor que 0,05	"p" encontrado maior que 0,05
C X I	36	26	0,005	---
C X S	33	24	0,006	---
C X E	29	23	0,001	---
I X S	27	14	---	0,499
I X E	36	19	---	0,433
S X E	29	15	---	0,499

C = Congênita  
I = Imaculada

S = Sonia  
E = Elza

Pela aplicação do teste de Friedman encontrou-se um valor calculado  $X^2_r = 12,82$  maior que o valor tabelado  $X^2_{3; 0,01} = 11,3$ . Assim sendo, a probabilidade de que as variações nos resultados dos 4 testes tenham ocorrido por acaso é menor que 1%. Portanto aceita-se também que haja diferenças entre os antígenos.

## DISCUSSÃO

Entre as várias técnicas laboratoriais para o diagnóstico da toxoplasmose, atualmente tem sido mais utilizada a reação de imunofluorescência indireta por sua maior simplicidade. Entretanto, as diferenças de técnicas, equipamentos e reagentes de diversas partidas podem ser responsáveis por discrepâncias de resultados algumas vezes encontradas em um mesmo soro analisado.

Tem sido pouco estudada a importância da variação dos antígenos quanto à sua origem e preparação, na reprodutibilidade dos resultados.

Neste trabalho, utilizaram-se 4 antígenos de diferentes procedências e manteve-se constante a técnica de preparo dos antígenos, assim como todas as etapas da reação.

A análise dos resultados encontrados, pela aplicação de mais de um teste estatístico, evidenciou que a cepa "C" quando utilizada como antígeno na reação de imunofluo-

rescência indireta, demonstra uma tendência significativa a apresentar títulos mais elevados que as outras três cepas estudadas. Em relação à comparação entre estas outras três cepas, "I", "S" e "E" entre elas, quando utilizadas como antígeno, as diferenças entre os títulos observados não foram estatisticamente significantes.

Essa tendência a resultados mais elevados para a cepa "C" pode estar relacionada a diferenças antigênicas. Tais diferenças antigênicas já têm sido relatadas em relação a cepas de outros protozoários parasitos ou não.

Em relação ao *Toxoplasma gondii*, Watre e cols., 1969, demonstraram pela análise imuno-eletrorética dos antígenos, a presença de 4 a 7 frações distintas. Esses autores demonstram a utilidade de separar e purificar essas frações a fim de que as reações sorológicas de fixação de complemento sejam efetuadas em presença de um antígeno estandarizado, evitando-se assim variações antigênicas como possíveis causas dos resultados discrepantes.

Por outro lado, Bloomfield & Remington, 1970, utilizando técnica semelhante, não encontraram diferenças antigênicas importantes entre as 3 cepas de toxoplasma que estudaram.

Nas 4 cepas presentemente comparadas, ao menos uma delas parece apresentar um comportamento diferente das outras três quando utilizadas como antígeno para pesquisa de anticorpos séricos pela imunofluorescência indireta, devendo-se salientar que a cepa "C" é procedente de um caso de toxoplasmose humana congênita, enquanto que as outras três foram isoladas de casos humanos de toxoplasmose linfoglandular.

Outro fato que deve ser relacionado diz respeito ao tempo em que as cepas vêm sendo mantidas em laboratório. A cepa "C" por mais de 10 anos em passagens sucessivas em camundongos e as outras três entre 3 e 4 anos apenas. As passagens sucessivas em camundongos são capazes muitas vezes de modificar a virulência das cepas de toxoplasma, como tem sido demonstrado por Coutinho & Mendonça, 1975, sendo que estas diferenças de comportamento entre cepas poderiam ter relação com possíveis diferenças antigênicas.

Todos esses dados demonstram que os títulos de anticorpos séricos para toxoplasmose por imunofluorescência indireta podem sofrer variações relacionadas com os antígenos usados. Assim sendo, além da padronização da técnica da reação, do equipamento óptico e dos reagentes, é necessária também a padronização do antígeno.

De acordo com Niel, Desmonts & Gentilini, 1973, uma forma de contornar-se em parte essas variações encontradas, é a utilização de soros de referência padronizados em unidades internacionais, podendo ainda fazer-se as equivalências em títulos baseados nas diluições séricas, como referem Camargo e cols. 1977.

Esses soros-padrão atualmente podem ser obtidos através da O.M.S. 1968.

## SUMMARY

*Reproductiveness of the Indirect Immunofluorescence Reaction for the Investigation of Serum Antibodies for Toxoplasma Gondii, Using 4 Different Strains of the Parasite as Antigen.*

Four different strains of *Toxoplasma gondii* were used as antigens for indirect immunofluorescence reaction (RIFI) in order to study the influence of the titers of the antibodies.

One of the strains ("C" strain) was isolated from a human congenital toxoplasmosis case and the other three ("I", "S" and "E" strains), from human lymphoglandular toxoplasmosis cases.

Of the 72 human sera examined by RIFI, 13 were found to be non-reagents in the 1 : 16 dilution when using each of the 4 strains as antigen.

In only 5 sera there was agreement of the antibodies titers when using the 4 strains as antigen, one of them being concordant in the 1 : 16 dilution and the other four in the 1 : 64 dilution.

In the remaining 54 sera examined, different titers were observed in one to three, four foulds dilutions, according to the strain used as antigen.

Statistical testing of results showed these differences to be significant in relation to the "C" strain and non-significant at a 5% level in relation to the "I", "S" and "E" strains.

The tendency to more elevated titers of serum antibodies when using the "C" strain may be related to antigenic variations.

For a good reproductiveness of results by the RIFI it is necessary to standardize not only the reaction techniques, optical equipament and reagents, but also the antigen used.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Paulo Chagastelles Sabrosa, da Área de Epidemiologia da ENSP, pelo estudo estatístico realizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOOMFIELD, M. M. & REMINGTON, J. S. — Comparison of three strains of *Toxoplasma gondii* by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Trop. Geogr. Med.* 22 :367, 1970.
- CAMARGO, M. E. — Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a toxoplasmose em 1000 soros humanos. Comportamento anômalo de alguns soros. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 24 :1, 1964.
- CAMARGO, M. E., LESER, P. G. & LESER, S. P. — Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. I e II. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 18 :215, 1976.
- CAMARGO, M. E., LESER, P. G., GUIARNIERI, D. B. & ROCCA, A. — Padronização de testes sorológicos para toxoplasmose, problema urgente da patologia clínica. *Rev. Bras. Pat. Clin.* 13 :1, 1977.
- COUTINHO, S. G., ANDRADE, C. M., MALVAR, G. S. & FERREIRA, L. F. — Análise comparativa entre as sensibilidades da reação indireta de anticorpos fluorescentes e da reação de Sabin-Feldman na pesquisa de anticorpos séricos para toxoplasmose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 4 :315, 1970.
- COUTINHO, S. G. & MENDONÇA, L. R. M. — Dados preliminares sobre duas cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas de casos humanos de toxoplasmose linfoganglionar. X Congresso da Sociedade Bras. Med. Trop. 1974.
- COUTINHO, S. G. & MENDONÇA, L. R. M. — Estudo da virulência para camundongos de 4 amostras de *Toxoplasma gondii* isoladas de casos humanos. XI Congresso da Soc. Bras. Med. Trop. 1975.
- GUIMARÃES, N. F., GRYNBERG, N., LAGE, H. A. & VENANCIO, I. A. — Reação indireta de anticorpos fluorescentes no diagnóstico da toxoplasmose. *J. Bras. Med.* 15 :89, 1968.
- KARIM, K. A., & LUDLAM, G. B. — The relationship and significance of antibody titres as determined by various serological methods in glandular and ocular toxoplasmosis. *J. Clin. Pat.* 28 :42, 1975.
- NIEL, G., DESMONTS, G. & GENTILINI, M. — Immunofluorescence quantitative et diagnostic serologique de la toxoplasmose: introduction des unites internationales dans l'expression des positivites. *Path. Biol.* 21 :157, 1973.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE — Comité de expertos de la OMS en patrones biológicos. Série de informes técnicos nº 384, 1968.
- REMINGTON, J. S. — The present status of the IgM fluorescent antibody technique in the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J. Pediatr.* 75 :1116, 1969.
- SIEGEL, S. — Estatística não paramétrica (para as ciências do comportamento). Ed. McGraw-Hill do Brasil Ltda. — São Paulo, 1975.
- WALTON, B.C. — Seroepidemiology of toxoplasmosis — *J. Parasitol.* 57 : sec. II, part. II, p. 115, 1971.
- WATTRE, P., BRULE, R., CAPRON, A., SAMAILL, J. & FRUIT, J. — Analyse antigenique de *Toxoplasma gondii* et diagnostic immunologique de la toxoplasmose humaine — *Annales de L'Institute de Lille.* XX— 167, 1969.