

# ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS SENSIBILIDADES DA REAÇÃO INDIRETA DE ANTICORPOS FLUORESCENTES E DA REAÇÃO DE SABIN-FELDMAN NA PESQUISA DE ANTICORPOS SÉRICOS PARA TOXOPLASMOSE (\*)

Sérgio Gomes Coutinho \*\* Carlos Mauricio de Andrade \*\*\* Gilsea Sarmento  
Malvar \*\*\*\* e Luiz Fernando Ferreira \*\*\*\*\*

*284 sôros provenientes de doadores de sangue no Rio de Janeiro, foram submetidos à reação de Sabin Feldman (R.S.F.) e à reação indireta de anticorpos fluorescentes (R.I.A.F.) para toxoplasmose.*

*Foram observados 37 resultados concordantes negativos, 216 resultados concordantes positivos e 31 resultados não concordantes quanto a positividade e negatividade, sendo que entre estes últimos houve um maior número de resultados positivos na R.S.F. do que na R.I.A.F.*

*A percentagem de resultados concordantes quanto a positividade ou negatividade foi de 89%.*

*Entre os 216 sôros que reagiram em ambas as reações 143 apresentaram títulos idênticos, o que representa uma proporção de 66,2%. Se forem consideradas como concordantes ou títulos positivos diferentes em apenas uma diluição ao quádruplo, a proporção de resultados positivos concordantes atinge a cerca de 99%.*

*Os presentes resultados confirmaram o estreito paralelismo entre as duas reações, podendo a R.I.A.F. ser utilizada rotineiramente para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose.*

## INTRODUÇÃO

Entre os testes utilizados para o diagnóstico sorológico da Toxoplasmose, a reação de Sabin-Feldman deve ser, segundo Betz (2), considerada como básica, servindo de referência para a comparação de outras técnicas diagnósticas. De acordo com Feldman (11), é ainda o sistema mais específico e sensível para medir anticorpos

para Toxoplasmose. Apresenta entretanto alguns inconvenientes que vários autores já chamaram a atenção e que se referem principalmente a utilização do toxoplasma vivo e a necessidade do "fator acessório".

A partir dos trabalhos de Coons e col. (7), a utilização de anticorpos fluorescentes como técnica diagnóstica foi sendo difundida, tendo Goldman (15, 16, 17) idealizado a sua aplicação para o diagnóstico

\* Trabalho do Departamento de Ciências Biológicas da Fundação Ensino Especializado de Saúde Pública (FENSP).

\*\* Professor Adjunto — Departamento de Ciências Biológicas.

\*\*\* Auxiliar de Ensino — Departamento de Ciências Biológicas.

\*\*\*\* Assistente de Ensino — Departamento de Estatística (FENSP)

\*\*\*\*\* Chefe do Departamento de Ciências Biológicas — Professor Titular de Parasitologia.

da Toxoplasmose, utilizando um teste baseado na inibição da fluorescência específica.

Trabalhos subseqüentes de Kelen e cols. (18) e Camargo (4), verificaram que a técnica de inibição da fluorescência empregada por Goldman (16, 17) não oferecia resultados tão satisfatórios quanto a técnica indireta de anticorpos fluorescentes desenvolvida por Weller e Coons (28).

Esta última técnica com algumas modificações vem sendo utilizadas por diversos autores.

Entre as vantagens da reação indireta de anticorpos fluorescentes (R.I.A.F.) sobre a reação de Sabin-Feldman (R.S.F.) coloca-se a possibilidade de utilização de toxoplasmas mortos como antígenos e de tornar dispensável o "fator acessório". De outro lado, uma das grandes dificuldades da R.I.A.F., a utilização de conjugados fluorescentes de antigamaglobulina, vem sendo superada pela possibilidade de serem adquiridos no comércio, conjugados de boa qualidade. Entretanto, uma das limitações da R.I.A.F., refere-se à necessidade de microscopia com fonte de iluminação ultra-violeta, o que pode constituir-se em um obstáculo para a realização da reação.

No entanto, o que dificulta realmente tanto o emprêgo do R.S.F. como da R.I.A.F. em maior número de laboratórios, refere-se à necessidade do emprêgo do toxoplasma vivo ou recentemente morto e mantido em "freezer", conforme a reação que se empregar. Assim sendo, é necessário manter o protozoário em laboratório seja por intermédio de repiques da cepa em peritônio de camundongo, seja por intermédio de outras técnicas menos freqüentemente utilizadas, mas sempre empregando-se tecido vivo, uma vez que o toxoplasma é um parasito que só pode ser cultivado na célula viva.

No entanto, com relação a R.I.A.F., existe a possibilidade dêste inconveniente vir a ser em parte superado, tendo em vista os trabalhos de Takumi e cols. (25) e Coudert e cols. (8) que empregaram um liofilizado de toxoplasmas como antígeno, na técnica de imunofluorescência indireta, obtendo bons resultados, sendo que Takumi e cols. (25) encontraram resultados comparáveis as do teste de hemaglutinação.

No presente trabalho são comparados resultados obtidos pelo R.S.F. e R.I.A.F. com objetivo de obter-se uma experiência sobre a sensibilidade desta última reação, uma vez que se pretende utilizá-la em trabalhos mais amplos sobre a Toxoplasmose na região (10).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 284 sôros provenientes de doadores de sangue do Instituto de Hematologia Artur de Siqueira Cavalcanti do Rio de Janeiro para a comparação entre a reação de Sabin e Feldman e a reação indireta de anticorpos fluorescentes para o diagnóstico sorológico da Toxoplasmose.

O sangue para exame sempre foi coletado pela manhã, estando os doadores em jejum. Cerca de 2 a 3 horas após, os sôros eram separados e mantidos à  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 a 5 dias até ser realizada a R.I.A.F. e R.S.F. Em geral uma das reações era efetuada com intervalo de um a três dias da outra, sem que se tivesse conhecimento da primeira quando se efetuasse a segunda.

### Técnicas das reações:

#### a) Reação de Sabin e Feldman.

Utilizou-se a técnica original de Sabin e Feldman (21, 22) com pequenas modificações, e que já havia sido empregada em trabalho anterior (9).

Para obter-se os toxoplasmas, injetou-se 3 ml de solução de citrato de sódio a 3,8% por via intraperitoneal em camundongo com dois dias de infecção e a seguir aspirou-se o líquido peritoneal, rico em *Toxoplasma gondii*.

Os sôros utilizados como fator acessório foram provenientes na maioria das vezes de adultos jovens, funcionários da Instituição a que pertencemos, já testados anteriormente, demonstrando funcionar convenientemente, sem que houvesse necessidade dos sôros serem diluídos.

A solução corante foi preparada no momento da reação, juntando-se 1,5 ml de solução alcoólica saturada de azul de metileno, (1 g de azul de metileno em 65 ml de álcool anidro) a 5 ml de solução tam-

pão pH = 11. Esta última solução teve a seguinte constituição:

Carbonato de sódio a 0,53% ——— 9,73 ml  
Borato de sódio a 1,91% ——— 0,27 ml

Os sôros dos doadores de sangue a serem examinados foram diluídos em solução aquosa de cloreto de sódio a 0,85% a partir da diluição 1 : 16 e a seguir sucessivamente 1 : 64, 1 : 256, 1 : 1024, 1 : 4096.

Colocou-se em tubos 0,1 ml de cada uma destas diluições as quais juntou-se 0,1 ml de uma mistura de uma parte de exsudato peritoneal de camundongos com 2 dias de infecção e quatro partes de fator acessório. Os tubos após serem arrolhados eram levados ao banho-maria a 37°C durante uma hora. Em seguida eram colocados em geladeira a 4°C e posteriormente retirados parceladamente no momento de ser efetuado o teste do corante.

Juntou-se, então, a cada tubo, cerca de 0,02 ml da solução corante tamponada de azul de metileno e após misturar-se bem e deixar em repouso por 5 minutos, retirou-se uma gota da mistura e colocou-se entre lâmina e lamínula para ser efetuada a leitura microscópica com aumento de 400 vezes. Eram então contados 50 toxoplasmas extracelulares, e as diluições eram consideradas positivas, quando mais de 50% dos protozoários apresentassem-se não corados.

No caso de contagens muito aproximadas de elementos corados e não corados, aumentou-se até 100 o número de organismos observados.

O título do soro examinado foi dado pela maior diluição em que ainda predominassem as formas não coradas. No caso de soro positivo na diluição de 1 : 4096, repetiu-se a reação no dia seguinte a partir da diluição 1 : 4000 e em múltiplos de 2 até 1 : 32000.

Em tôdas as vezes que se realizou a reação, teve-se o cuidado de fazer-se concomitantemente uma reação com soro positivo de título já conhecido, e também o teste negativo. Para êste último juntou-se 0,1 ml de solução de cloreto de sódio a 0,85%, a 0,1 ml da mistura 1 : 4 de exsudato peritoneal mais fator acessório. Os procedimentos subseqüentes obedeceram a mesma técnica da reação sendo que na contagem dos organismos corados e não

corados deviam predominar os corados em proporção igual ou superior a 90%.

b) Reação indireta de anticorpos fluorescentes:

A técnica empregada, foi a utilizada por Camargo (5) e Nery-Guimarães (20), com algumas modificações. Os toxoplasmas utilizados como antígeno foram obtidos de exsudato peritoneal de camundongo, da mesma maneira empregada para a reação de Sabin e Feldman.

Ao exsudato peritoneal com citrato de sódio a 3,8%, acrescentou-se igual quantidade de solução contendo 2% de formalina em solução salina tamponada pH 7,2, deixando-se a mistura em repouso com agitação ocasional por 30 minutos. Esta solução tamponada era preparada em estoque, 20 vezes concentrada, para ser diluída em água destilada conforme as necessidades de uso.

No preparo da solução estoque foi obedecida a seguinte composição:

Na Cl .....	170,0 g
Na <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> — 7 H <sub>2</sub> O .....	42,283
Na H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> — H <sub>2</sub> O .....	4,423
H <sub>2</sub> O destilada .....	q. s. p. 1.000

Após os 30 minutos de repouso, o material rico em toxoplasmas, era centrifugado a 500 r.p.m. durante 5 minutos, para a sedimentação dos leucócitos e a seguir o sobrenadante era centrifugado a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos para concentrar os toxoplasmas. Êstes eram então suspensos em uma quantidade de solução de cloreto de sódio a 0,85% suficiente para conseguir-se uma boa concentração dos protozoários nos esfregaços em que seriam feitas as reações. A primeira centrifugação a 500 r.p.m. permitiu que os preparados ficassem quase totalmente livres de leucócitos.

Com esta suspensão de toxoplasmas eram feitos esfregaços em lâminas bem limpas por intermédio de fervura em solução detergente, imersão por 24 horas ou mais em álcool etílico a 90°, lavagem em água destilada e finalmente as lâminas eram flambadas. Muitas vezes era feito novo esfregaço sobre o primeiro, para conseguir-se uma concentração suficiente de

toxoplasmas por campo microscópico. Com o segundo esfregaço seco em temperatura ambiente eram feitos sobre eles dois grupos de cinco retângulos de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> cada um, utilizando-se esmalte de unha. Em cada grupo de cinco retângulos, colocou-se as diluições de cada soro a ser testado, já inativado a 56°C por 30 minutos. As diluições do soro eram feitas em solução de cloreto de sódio a 0,85% a partir de 1 : 16 e sucessivamente em múltiplos de quatro até 1 : 4096. Quando necessário, continuou-se a diluição a partir de 1 : 4000 e sucessivamente em múltiplos de 2 até 1 : 32.000. Aproximadamente 0,01 ml de cada diluição era pipetado nos respectivos retângulos sobre o esfregaço e uma vez colocadas as lâminas em câmara úmida, eram levadas à estufa a 37°C durante uma hora, para processar-se a primeira fase da reação antígeno-anticorpo.

Terminada esta etapa, as gotículas das diluições dos soros sobre os esfregaços eram desprezadas e as lâminas submetidas a dois processos de lavagem, durante 10 minutos cada um, imergindo-se as lâminas em duas trocas da solução salina tamponada com fosfatos, a mesma já descrita anteriormente.

Depois da lavagem, cada retângulo foi cuidadosamente seco com papel de filtro evitando-se movimentos mais bruscos que pudessem prejudicar a preparação.

Uma vez secos, cada retângulo era preenchido com aproximadamente 0,01 ml do conjugado antigama globulina humana (Ig G humana) —isotiocianato e fluoresceína, fabricado por Microbiological Ass. Inc.. As preparações eram novamente colocadas em câmara úmida e levadas à estufa a 37°C durante uma hora para processar-se a segunda fase da reação anticorpo-anticorpo conjugado com isotiocianato de fluoresceína.

Após este tempo, desprezou-se o excesso do conjugado fluorescente sendo as lâminas submetidas a dois processos de lavagem de 5 minutos cada um, por imersão em duas trocas da solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2. As lâminas eram novamente secas, principalmente as áreas limitadas pelos retângulos, usando-se papel de filtro com os cuidados já ci-

tados para evitar-se dano nas preparações. A seguir as lâminas eram montadas colocando-se uma laminula cobrindo cada grupo de cinco retângulos tendo-se anteriormente pipetado uma gota de solução tamponada de glicerina sobre cada grupo de retângulos.

As lâminas assim preparadas eram examinadas no mesmo dia, em um aumento de 400 vezes, utilizando-se equipamento Wild com fonte de iluminação ultravioleta fornecida por lâmpada de vapor de mercúrio HBO-200.

Os títulos dos soros desconhecidos eram dados pela maior diluição em que a maioria dos toxoplasmas ainda apresentasse nítida fluorescência de tonalidade esverdeada, em toda a sua periferia. Nas reações negativas os toxoplasmas eram distinguíveis contra o fundo escuro, apesar de não apresentarem fluorescência evidente em toda a sua periferia. Em cada grupo de reações sempre incluiu-se um soro positivo de título conhecido e outro de título negativo para que a técnica estivesse sendo sempre testada. Estes soros controles foram selecionados entre aqueles que haviam apresentado títulos idênticos tanto pela reação de Sabin Feldman como pela reação de imunofluorescência indireta.

Em ambas as reações, os soros foram considerados negativos quando não reagiram na diluição de 1 : 16.

## RESULTADOS

O exame pelas reações de Sabin e Feldman e reação indireta de anticorpos fluorescentes de 284 soros provenientes de doadores de sangue, evidenciou os seguintes resultados:

Inicialmente, levando-se em conta apenas resultados negativos e positivos, não importando o título entre estes últimos, observou-se a seguinte distribuição:

Resultados concordantes negativos em 37 casos.

Resultados concordantes positivos em 216 casos.

Resultados não concordantes quanto a positividade e negatividade em 31 casos.

Observaram-se assim 253 resultados concordantes positivos e negativos em um total de 284 soros examinados o que representa uma percentagem de 89,08%

Entretanto, o cálculo dos resultados concordantes pode tornar-se mais preciso se forem retirados os 37 casos negativos em ambos os métodos, pois em qualquer técnica de menor sensibilidade, estes resultados seriam negativos, e portanto concordantes, o que poderia falsear a comparação entre os métodos.

Assim sendo, foram encontrados 216 resultados concordantes positivos em um total de 247 casos com uma proporção de concordância, de 87,4%, que ao nível fiducial de 5% está contida no intervalo de confiança de 83,5% e 91,3%.

Dos 31 casos não concordantes quanto à negatividade e positividade, verificou-se:

R.S.F. positiva e R.I.A.F. negativa em 22 casos.

R.S.F. negativa e R.I.A.F. positiva em 9 casos.

Houve portanto um maior número de resultados positivos em R.S.F. do que em R.I.A.F., sendo que esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa em um nível fiducial de 5%, quando analisada

pelo teste de proporções:  $t$  calculado = 2,335 maior que  $t$  tabelado = 1,645.

Se entretanto levar-se em conta os resultados, não somente quanto a negatividade ou positividade mas também quanto à variação dos títulos entre os positivos, os 284 doadores passam a ser distribuídos segundo o quadro I.

Neste quadro estão grifados os números referentes à quantidade de casos que apresentaram títulos positivos idênticos em ambas as reações, o que representa um total de 143 casos.

Sendo assim, do total de 126 sôros que reagiram em ambas as técnicas, 143 apresentaram títulos idênticos o que representa uma proporção de 66,2% que está contida no intervalo de confiança de 59,9% a 72,4% com um nível fiducial de 5%. Se entretanto considerarmos como concordantes tanto os resultados idênticos como os diferentes em apenas uma diluição, a proporção de concordância entre os resultados positivos sobe a cerca de 99%.

Como já foi visto, foram encontrados 143 títulos idênticos e portanto 104 títulos

## QUADRO I

## DISTRIBUIÇÃO DOS 284 DOADORES DE SANGUE SEGUNDO O TÍTULO DAS REAÇÕES DE ANTICORPOS FLUORESCENTES E DE SABIN E FELDMAN

REAÇÃO INDIRETA DE ANTICORPOS FLUO- RESCENTES TÍTULOS	SABIN E FELDMAN						TOTAIS
	TÍTULOS						
	< 1 : 16	1 : 16	1 : 64	1 : 256	1 : 1024	1 : 4096	
< 1 : 16 . . . . .	37	20	2	—	—	—	59
1 : 16 . . . . .	8	54	28	1	—	—	91
1 : 64 . . . . .	1	15	69	11	—	—	96
1 : 256 . . . . .	—	1	13	18	2	—	34
1 : 1024 . . . . .	—	—	—	2	1	—	3
1 : 4096 . . . . .	—	—	—	—	—	1	1
TOTAIS . . . . .	46	90	112	32	3	1	284

diferentes nas duas reações, entre os 247 sôros que reagiram em ambas as técnicas ou em apenas uma delas. O quadro II expressa a distribuição desses 104 casos de títulos diferentes, quanto ao sentido da diferença, isto é, se o título observado em R.S.F. foi maior que o observado em R.I.A.F. ou vice versa. Neste mesmo quadro, os casos também estão separados quanto à magnitude das diferenças observadas entre os resultados das duas reações: Na Tabela A as discrepâncias em apenas um tubo das diluições e na tabela B as discrepâncias em dois tubos.

Para verificar se entre os casos de resultados diferentes uma das reações apresentou resultado significativamente mais elevado que a outra, foi aplicado o teste estatístico de diferença de proporções. Entretanto, dos 104 casos a serem analisados, os 5 casos em que as discrepâncias foram mais intensas, (quadro II Tabela B) não permitem uma análise estatística, pois

o número de observações foi muito pequeno. No entanto, nestes 5 casos pareceu não ter havido tendência de qualquer das duas reações a apresentar resultados mais elevados com maior frequência, pôsto que em 3 casos R.S.F. apresentou o título mais elevado e em 2 casos a R.I.A.F. foi que apresentou o título mais elevado.

Dos 99 casos restantes, (quadro II Tabela A) em 61 deles a R.S.F. apresentou resultado mais elevado que a R.I.A.F. e nos outros 38, a R.I.A.F. apresentou mais elevado que a R.S.F. Para que esta diferença entre a R.S.F. e a R.I.A.F. não fosse significativa seria necessário que em 50% dos casos, a R.S.F. apresentasse o título superior e nos outros 50% a R.I.A.F. apresentasse o título superior. No entanto, este fato não ocorreu pois os 61 casos em que a R.S.F. apresentou título superior à R.I.A.F., representam mais de 50% dos 99 casos observados. O teste de diferença de proporções demonstrou ser signi-

#### QUADRO II

DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS QUE APRESENTARAM RESULTADOS DIFERENTES EM R.S.F. E R.I.A.F., QUANTO AO SENTIDO DA VARIAÇÃO (R.S.F. MAIOR QUE R.I.A.F. OU VICE VERSA). OS CASOS AINDA ESTÃO DIVIDIDOS EM DUAS TABELAS "A" E "B", QUANTO A MAGNITUDE DA DISCREPÂNCIA ENTRE R.S.F. E R.I.A.F.

	Faixa em que se verificou a discordância entre R.S.F. e R.I.A.F.	R.S.F. maior que R.I.A.F.	R.I.A.F. maior que R.S.F.	TOTAL
T A B E L A  "A"	< 1 : 16 — 1 : 16 .....	20	8	28
	1 : 16 — 1 : 64 .....	28	15	43
	1 : 64 — 1 : 256 .....	11	13	24
	1 : 256 — 1 : 1024 .....	2	2	4
	Total Parcial .....	61	38	99
T B E L A  "B"	< 1 : 16 — 1 : 64 .....	2	1	3
	1 : 16 — 1 : 256 .....	1	1	2
	Total Parcial .....	3	2	5
	TOTAL .....	64	40	104

ficante esta diferença, sendo maior a frequência de resultados mais elevados na R.S.F. do que na R.I.A.F. pôsto que o  $t$  calculado = 2,312 foi superior ao  $t$  tabelado = 1,645, para um nível fiducial de 5%.

Pode-se ainda observar pelo quadro II que a predominância de resultados mais elevados na R.S.F. do que na R.I.A.F. foi mais significativa nas diluições mais baixas, quando as diferenças encontradas estavam entre resultados negativos e positivos a 1:16 e entre os resultados positivos a 1:16 e 1:64 ( $t$  calculado = 2,268 e 1,982 respectivamente).

### COMENTÁRIOS

Das várias técnicas utilizadas para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose, a R.I.A.F. vem sendo utilizada em vários laboratórios, principalmente por ser bastante prática e de fácil manêjo, sem representar maior risco de constituir-se em fonte de infecção toxoplásmica para aqueles que a manuseiam.

No quadro III estão resumidos os resultados encontrados por vários autores que utilizaram a R.I.A.F. comparando-a com a R.S.F.

Apesar das variações entre as técnicas utilizadas na R.S.F. e principalmente na R.I.A.F. os resultados podem ser considerados como passíveis de comparação. Entre as variações na técnica da R.I.A.F. destaca-se o tempo de incubação a 37°C para processar-se a reação antígeno anticorpo, que variou de 15 minutos a 1 hora segundo os autores.

Os conjugados fluorescentes utilizados, também foram de origem diferente para quase todos os autores, assim como variou em maior ou menor grau a técnica de preparo do antígeno. Este último foi preparado na maioria das vezes a partir do líquido peritoneal de camundongos infectados. Boisseau e cols. (3) o utilizou em suspensão e não depois de seco em lâminas como a maioria dos autores. Por outro lado, Betz (2) utilizou toxoplasmas em culturas de tecido e Van Nunem e col. (26) usaram cortes em criostado de cérebro de

camundongos inefetados pelo *Toxoplasma gondii*, como antígeno para a R.I.A.F.

O soro para pesquisa de anticorpos foi de origem humana, exceto os utilizados por Suzuki e cols. (24) que eram provenientes de porcos.

Apesar destas variações além de outras, na técnica da R.I.A.F. os resultados resumidos no quadro III podem ser considerados como concordantes dentro de limites estreitos. Neste quadro, incluímos nossos resultados concordantes negativos no conjunto dos resultados concordantes, para que pudessem ser comparados com os encontrados pela maioria dos autores citados. Sendo assim, as percentagens dos resultados concordantes quanto a negatividade e positividade variaram segundo os autores de 73,5% a 100%. A percentagem de concordância mais baixa foi encontrada por Kelen e cols. (18) e poderia estar relacionada segundo Camargo (4) com o tempo de incubação a 37°C, de apenas 30 minutos, que utilizaram na técnica da R.I.A.F.

Kelen e cols. (18) encontrando 159 soro negativos na R.I.A.F. e positivos na R.S.F. e apenas 4 soro positivos na R.I.A.F. e negativos na R.S.F., acreditam que seus resultados falam a favor dos que expressam dúvida sobre a validade da R.S.F. especialmente sobre a interpretação dos títulos abaixo. Entretanto, as discordâncias entre os resultados positivos e negativos encontradas por outros autores nunca foram tão intensas quanto as observadas por Kelen e cols. (18).

Nossos resultados evidenciaram que apesar de uma alta correlação entre resultados positivos e negativos nos dois métodos, que atingiu o intervalo de confiança de 82,7% a 91%, os poucos resultados discordantes apresentaram um número significativamente maior de resultados positivos na R.S.F. do que na R.I.A.F.

Deve-se ainda ressaltar que dos 31 casos em que houve discordância entre resultados negativos e positivos, em 28 deles esta discordância ocorreu entre o resultado negativo e a primeira diluição positiva — 1:16.

QUADRO III

SUMÁRIO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS POR DIVERSOS AUTORES QUANDO COMPARARAM A REAÇÃO DE SABIN E FELDMAN (R.S.F.) E A REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (R.I.A.F.) PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA TOXOPLASMOSE

AUTORES E DATAS	Número de sôros examinados	Número de sôros negativos em R.S.F. e R.I.A.F.	Número de sôros positivos em R.S.F. e R.I.A.F.	Quantidade e percentagem de sôros concordantes negativos e positivos	Número de sôros discordantes quanto a positividade e a negatividade		Título positivo inicial das reações	
					Posit. em R.S.F. Negat. em R.I.A.F.	Negat. em R.S.F. Posit. em R.I.A.F.		
Kelen e cols. — 1962 .....	617	423	31	454	73,5%	159	4	1 : 8
Mandras e cols. — 1962 .....	16	0	15	15	93,7%	1	0	—
Garin e col. — 1963 .....	189	124	51	175	92,6%	5	9	1 : 20
Zardi — 1963 .....	121	78	38	116	95,8%	1	4	1 : 4
Camargo — 1964 .....	1000	225	768	993	99,3%	0	7	1 : 16
Fulton e col. — 1964 .....	20	5	14	19	95 %	0	1	1 : 8
Anderson e cols. — 1965 .....	102	33	49	82	80,4%	11	9	1 : 8
Fletcher — 1965 .....	25	1	21	22	88 %	0	3	1 : 8
Suzuki e cols. — 1965 .....	78	24	45	69	88,4%	3	6	1 : 16
Van Nunen e col. — 1965 .....	341	137	160	297	87,1%	10	34	1 : 32
Wery — 1965 .....	30	4	25	29	96,6%	0	1	1 : 20
Capponi — 1966 .....	64	39	10	49	76,5%	3	12	1 : 20
Walton e cols. — 1966 .....	1000	500	475	975	97,5%	0	25	1 : 8
Boisseau e cols. — 1967 .....	65	4	61	65	100 %	0	0	1 : 10
Betz — 1968 .....	91	23	57	80	87,9%	4	7	RSF - 1 : 16 RIAF - 1 : 20
Nery - Guimarães e cols. — 1968 .....	200	78	80	158	79 %	16	26	1 : 16
Ccutinho e cols. — 1970 .....	284	37	216	253	89 %	22	9	1 : 16



Van Nunen e col. (26) e Wery (29) além de outros, referem resultados semelhantes sendo que Camargo (4), encontrou 7 séros com resultados discrepantes, todos negativos na R.S.F. e positivos na R.I.A.F. na diluição mais baixa 1 : 16.

Também entre os 216 séros que reagiram em ambas as técnicas, a proporção de resultados idênticos, contida no intervalo de confiança de 59,7% e 72,2% é bastante elevada, tornando-se ainda mais nítido o paralelismo entre as duas reações se forem considerados como concordantes os séros que apresentaram resultados diferentes por apenas um tubo de diluição. Neste caso a proporção de resultados considerados concordantes atingiria a mais de 99%. A comparação destes resultados com os de outros autores, nem sempre é fácil porque muitas vezes o intervalo entre as diluições dos séros foram feitas em múltiplos de 2, outras vezes em múltiplos de 4 como em nosso material. Também a diluição inicial do soro considerada positiva variou de autor para autor. Entretanto, em uma revisão feita por Nery-Guimarães e cols. (20), a percentagem de títulos coincidentes ou diferentes por apenas uma diluição, variou segundo os autores de 50% a 100%.

Nossos resultados entre os séros positivos nas duas reações, evidenciaram que ao lado da alta percentagem de títulos idênticos, os títulos diferentes, quando ocorreram, o foram com maior frequência entre as diluições mais baixas.

Outros autores também encontraram o maior número de discrepâncias entre as duas reações nas diluições mais baixas, e resultados superponíveis nas diluições mais elevadas. Kelen e cols. (18) observaram boa concordância nas diluições de 1 : 1024 ou superiores. Segundo Garin e col. (14) a especificidade dos testes são indiscutíveis nas diluições altas. Fletcher (12) evidenciou boa concordância principalmente nos séros de títulos elevados, sendo que nas diluições baixas, o título encontrado na R.I.A.F. era inferior às vezes em uma ou duas diluições ao dobro. Nery-Guimarães e cols. (20) referem que o maior número de discrepâncias ocorreu nas diluições mais baixas, principalmente 1 : 16. Entretanto, estes autores assim como Mandras e cols. (19), Zardi (30), Camargo (4), Ful-

ten e col. (13), Suzuki e cols. (24) e Betz (2) são de opinião que os resultados da R.I.A.F. e R.S.F. são praticamente superponíveis. Capponi (6) e Walton e cols. (27) acreditam que a R.I.A.F. possa ser mais sensível, sendo que este último observou em seus resultados que tôdas as discrepâncias maiores de uma diluição ao quádruplo foram com a R.I.A.F. positiva na maior diluição. Por outro lado, Van Nunen e col. (26) e Wery (29) observaram que a R.S.F. parece ser discretamente mais sensível que a R.I.A.F.

Nossos resultados também demonstraram o estreito paralelismo entre as duas reações, mas com uma certa tendência da R.S.F. apresentar título mais elevado que a R.I.A.F. nas diluições mais baixas.

Boisseau e cols. (3) além de realçar o valor diagnóstico da R.I.A.F. apesar de algumas discordâncias com a R.S.F. na altura do título, observaram em infecção experimental de coelhos, que o título da R.I.A.F. no início da infecção era muito superior ao da R.S.F. e que com o equilíbrio da doença este passava a apresentar-se superior a R.I.A.F. Acreditam que este dado possa vir a estabelecer a fase da doença, se aguda ou já em período crônico.

Vale a pena realçar que quanto à especificidade da técnica de imunofluorescência, esta já foi bem demonstrada desde o trabalho inicial de Goldman (16) e a seguir também por Kelen e cols. (8), Fulton e col. (13) e Fletcher (12). A reprodutibilidade da R.I.A.F. foi constatada tanto por Camargo (4) como Van Nunen e col. (26) e mais particularmente por Sulzer e col. (23), que a consideraram comparável a da R.S.F.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração prestada por funcionários do Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti na coleta do material e principalmente ao Diretor daquele Instituto, Gen. Med. João Maia Mendonça, pelas facilidades que nos proporcionou.

Agradecemos também aos laboratórios Roche S/A pelo fornecimento dos conjuntos fluorescentes.

## SUMMARY

284 sera from blood donors in Rio de Janeiro, were submitted to the Sabin-Feldman reaction (RSF) and to the indirect fluorescence antibody (RIAF) reaction for toxoplasmosis.

In both reactions, 37 negative results were observed, 216 positive results and 31 results were positive by one test and negative by the other. Among these last results, there were more positive results by RSF than by RIAF. The percentage of agreement of the positive or negative results in both reactions was 89%.

Among 216 sera that reacted by both tests, 143 showed identical titres that represented a proportion of 66.2%. Positive titres that were different by only one quadruple dilution being taken into consideration, the proportion of agreement among these positive results increased to approximately 99%.

The present results confirm the close parallelism between the two reactions; the RIAF can be used as a routine for the serological diagnosis of toxoplasmosis.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 — ANDREONI, G., CURATOLO, D., ROCCHI, G., TOSTI, U., VELLI, V. — La diagnosi sierologica di Toxoplasmosi mediante il test indiretto di immunofluorescenza. — Giorn. Mal. Inf. Parass. 17: 144, 1965.
- 2 — BETZ, A. — Diagnostic serologique de la Toxoplasmose au moyen d'antigenes prepares sur cultures cellulaires. — Bull. Wld. Hlth. Org. 39: 367, 1968.
- 3 — BOISSEAU, M., MOULINIER, C., DE JOIGNY, C. — Immunofluorescence sur suspension de Toxoplasmes, comparaison avec le test de lyse — Bull. Soc. Path. Exot. 60: 205, 1967.
- 4 — CAMARGO, M. E. — Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a Toxoplasmose, em 1000 sôros humanos. Comportamento anômalo de alguns sôros. — Rev. Inst. Adolfo Lutz 24: 1, 1964.
- 5 — CAMARGO, M. E. — Preparation of microscopical slides to simplify immunofluorescence serological titrations. — Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 7: 39, 1965.
- 6 — CAPPONI, M. — Constatations personnelles pour le diagnostic serologique de la toxoplasmose pour l'immunofluorescence — Bull. Soc. Path. Exot. 59: 77, 1966.
- 7 — COONS, A. H., KAPLAN, M. H. — Localization of antigen in tissue cells. II Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. — J. Exp. Med. 91: 1, 1950.
- 8 — COUDERT, J., GARIN, J. P., AMBROISE THOMAS, T., KIEN TRUONG, T., RIGAUD, A., POTHIER, M. A., GEORGET, J. P. — Les antigenes lyophilisés en immunofluorescence, resultats preliminaires et perspectives d'avenir. — Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Nancy — N° 109: 9, 1968.
- 9 — COUTINHO, S. G., ANDRADE, C. M., LOPES, A. C., CHIARINI, C., FERREIRA, L. F. — Observações sobre a presença de anticorpos para Toxoplasma gondii, em cães de área suburbana do Rio de Janeiro. — Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2: 285, 1968.
- 10 — COUTINHO, S. G., ANDRADE, C. M., FERREIRA, L. F. — Tentativa de isolamento do *Toxoplasma gondii* do sangue de doadores no Rio de Janeiro. A ser publicado.
- 11 — FELDMAN, H. A. — Toxoplasmosis — New England J. Med. 279: 1370, 1968.
- 12 — FLETCHER, S. — Indirect Fluorescent Antibody Technique in the serology of *Toxoplasma gondii*. — J. Clin. Path. 18: 193, 1965.
- 13 — FULTON, J. D., VOLLER, A. — Evaluation of immunofluorescent and direct agglutination methods for detection of specific Toxoplasma antibodies. — Brit. Med. J. 2: 1173, 1964.
- 14 — GARIN, J. P., AMBROISE THOMAS, P. — Le diagnostic serologique de la Toxoplasmose par la methode des anticorps fluorescents (technique indirecte) — Presse Medicale 71: 2485, 1963.

- 15 — GOLDMAN, M. — Straining *Toxoplasma gondii* with fluorescein — labelled antibody. I The reaction in smears of peritoneal exudate — J. Exp. Med. 105: 549, 1957.
- 16 — GOLDMAN, M. — Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein — labelled antibody. II A new serologic test for antibodies to *Toxoplasma* based upon inhibition of specific staining. — J. Exp. Med. 105: 557, 1957.
- 17 — GOLDMAN, M., GORDON, M. A., CARVER, R. K. — Comparison of titers of dye and fluorescence — inhibition test in the serologic diagnosis of Toxoplasmosis — Amer. J. Clin. Path. 37: 541, 1962.
- 18 — KELEN, A. E., AYLLON-LEINDL, L., LABZOFFSKY, N. A. — Indirect fluorescent Antibody method in serodiagnosis of Toxoplasmosis. — Canad. J. Microbiol. 8: 545, 1962.
- 19 — MANDRAS, A., VANINI, G. C., CIARLINI, E. — La reazione di immunofluorescenza per la dimostrazione degli anticorpi contro *Toxoplasma gondii* — L'Igiene Moderna 55: 636, 1962.
- 20 — NERY-GUIMARAES, F., GRYNBERG, N., LAGE, H. A., VENANCIO, I. A. — Reação indireta de anticorpos fluorescentes no diagnóstico da Toxoplasmosse. — J. Bras. Med. 15: 89, 1968.
- 21 — SABIN, A. B., FELDMAN, H. A. — Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasit (*Toxoplasma*) — Science 108: 660, 1948.
- 22 — SABIN, A. B., EICHENWALD, H., FELDMAN, H. A., JACOBS, L. — Present status of clinical manifestation of Toxoplasmosis in man. Indications and provisions for routine serologic diagnosis — J.A.M.A. 150: 1063, 1952.
- 23 — SULZER, A. J., HALL, E. C. — Indirect fluorescent antibody test for parasitic diseases. IV Statistical study of variation in the indirect fluorescent antibody (IFA) test for Toxoplasmosis — Amer. J. Epidem. 86: 401, 1967.
- 24 — SUZUKI, K., SUTO, T., FUJITA, J. — Serological diagnosis of toxoplasmosis by the indirect immunofluorescent staining — Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 5: 73, 1965.
- 25 — TAKUMI, K., TAKEBAYASHI, I., TAKEUCHI, H., IKEDA, H., TOSHIOKA, N. — The use of lyophilized parasites in indirect fluorescent antibody technique for detection of toxoplasma antibody. — Japan. J. Microbiol. 10: 189, 1966.
- 26 — VAN NUNEM, M. C. J., VAN DER VEEN, J. — Examination for toxoplasmosis by the fluorescent antibody technique — Trop. Geogr. Med. 17: 246, 1965.
- 27 — WALTON, B. C., BENCHOFF, B. M., BROOKS, W. H. — Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detection of antibodies *Toxoplasma gondii*. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 15: 149, 1966.
- 28 — WELLER, T. H., COONS, A. H. — Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86: 789, 1954.
- 29 — WERY, M. — Indications de l'immunofluorescence dans la Toxoplasmosse clinique et expérimentale — Ann. Soc. Belge Med. Trop. 45: 541, 1965.
- 30 — ZARDI, O. — Gli anticorpi fluorescenti nella diagnostica per la toxoplasmosi — Nuovi Ann. d'Igiene e Microbiol. 14: 585, 1963.