

Braz. J. vet. Res. anim. Sci.,
São Paulo, v.32, n.1, p.11-6, 1995.

A AVIDEZ DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-TOXOPLASMA DA CLASSE IgG E SUA UTILIZAÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO ENTRE TOXOPLASMOSE RECENTE E CRÔNICA EM CAPRINOS

TOXOPLASMA - SPECIFIC IgG ANTIBODIES AVIDITY ELISA AND ITS ROLE IN THE DIFFERENTIATION BETWEEN RECENT AND CHRONIC TOXOPLASMOSIS IN GOATS

Maria Terezinha BAHIA¹; Ricardo Wagner de ALMEIDA VITOR²; Rogerio Pinheiro CALDAS³; Carlos Mauricio Figueiredo ANTUNES²; Cléa de Andrade CHIARI²

RESUMO

Foi avaliada a avidéz de anticorpos IgG como marcador sorológico de infecção recente e crônica pelo *Toxoplasma gondii*, através da dissociação do complexo antígeno-anticorpo com uréia. A avaliação foi realizada medindo-se a percentagem de queda (%Q) da absorbância, pelo ELISA, após a lavagem do complexo Ag - Ac formado com solução de uréia. Ficou determinado que a concentração de uréia 9 Molar (M) foi a que melhor diferenciou infecções recentes e crônicas de cabras experimentalmente infectadas com *Toxoplasma gondii*, e que a %Q da absorbância decresce com o tempo de infecção do animal, tornando-se estável em torno do 100º dia após a inoculação. Em um grupo de 116 amostras de soro, coletadas de caprinos naturalmente infectados, foram demonstrados perfis característicos de toxoplasmose recente, crônica ou em fase de transição. Os perfis foram previamente determinados pela avaliação da evolução dos níveis de anticorpos IgG pela reação de imunofluorescência indireta. Os animais caracterizados como portadores de toxoplasmose crônica apresentaram uma %Q da absorbância de $26,32 \pm 10,84$. Para toxoplasmose recente a %Q da absorbância observada foi de $77,61 \pm 13,89$ e para o perfil de transição, $46,22 \pm 11,94$.

UNITERMOS: Toxoplasmose; Infecções; IgG; Caprinos

INTRODUÇÃO

Na toxoplasmose caprina a associação dos níveis de anticorpos da classe IgG com a fase de infecção dos animais é extremamente difícil, mesmo em animais infectados experimentalmente⁸. Em infecções naturais, a observação dos níveis de anticorpos da classe IgG não permitem qualquer associação com a fase clínica da infecção⁴. Sendo assim, torna-se clara a necessidade de um marcador sorológico de fase aguda, a exemplo do que ocorre na toxoplasmose humana. Para o diagnóstico da toxoplasmose aguda, sintomática ou não, dois tipos de marcadores sorológicos são de valor¹. Um deles é representado por uma significativa ascensão dos títulos de anticorpos da classe IgG. Outro marcador de infecção recente é a presença de imunoglobulinas da classe IgM, evidenciadas normalmente através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Neste caso, resultados falso-positivos podem ocorrer nos soros contendo anticorpos antinucleares ou fator reumatóide². Reações falso-negativas são verificadas nos soros com altos títulos de anticorpos IgG. Outros testes imunológicos, como os

imunoenzimáticos, não sofrem as interferências citadas acima mas, por serem nitidamente mais sensíveis, passam a detectar anticorpos IgM por períodos mais longos, o que de certo modo pode prejudicar seu significado como marcador de infecção recente³.

Tem sido reconhecido um novo marcador sorológico, capaz de distinguir entre infecções recentes e antigas, que diz respeito à avidéz de anticorpos IgG específicos. Nas infecções recentes, uma alta percentagem desses anticorpos mostra baixa avidéz aos antígenos correspondentes. Durante o transcorrer de semanas ou meses após a infecção, esses anticorpos vão apresentando avidéz crescente, de modo que em infecções de mais longa duração, encontra-se um predomínio marcante de anticorpos de alta afinidade. A avaliação da avidéz é baseada na dissociação dos complexos antígeno-anticorpo (Ag - Ac) pela ação de agentes desnaturantes de proteínas ou desestabilizantes de ligações de pontes de hidrogênio^{5,7}. A utilização desta técnica como marcador de infecção recente já foi utilizada com sucesso na rubéola⁷ e na

1 - Doutor - Universidade de Alenas - MG

2 - Doutor - Universidade Federal de Minas Gerais

3 - Mestre - CAPRILEITE - Belo Horizonte - MG

toxoplasmose humana^{3,5}.

Este trabalho foi realizado objetivando a avaliação da determinação da avidéz de anticorpos IgG específicos como marcador sorológico de fase aguda da toxoplasmose caprina.

MATERIAL E MÉTODO

Soros utilizados

a) Soros de cinco caprinos experimentalmente infectados com a cepa C4 de *Toxoplasma gondii* foram coletados do 1º ao 500º dia após a inoculação (DAI). A cepa C4 foi isolada do pulmão de um cão necropsiado em 1972 no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

b) Soros de 200 caprinos normais ou naturalmente infectados pelo *Toxoplasma gondii* foram selecionados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), realizada de acordo com CHIARI⁴ (1985). Os animais normais foram submetidos a uma segunda coleta, com intervalo de dois meses, com o objetivo de detectar infecção recente pelo *Toxoplasma gondii*. Nos animais positivos da primeira coleta, uma segunda foi realizada 5 meses depois para avaliar a evolução dos níveis de anticorpos da classe IgG. Os 116 animais positivos foram divididos em três grupos, de acordo com a evolução dos níveis de anticorpos, seguindo os critérios utilizados para a toxoplasmose humana¹ (perfil sorológico): (1) 23 animais que apresentaram viragem sorológica (infecção recente); (2) 20 animais cujos títulos de anticorpos apresentaram uma queda entre duas coletas (transição entre fase aguda e crônica); (3) 73 animais cujo título de anticorpos não variou entre duas coletas (fase crônica).

Técnica empregada

Os soros foram ensaiados em duas séries de diluições na mesma placa, através do ELISA⁹. As lavagens das placas, após a fase de incubação dos soros, foram feitas para uma das séries de diluições, com solução salina tamponada contendo Tween 20 a 0,05% (PBST), em três períodos sucessivos de 5 min. sob agitação.

Para a outra série, as três lavagens foram feitas com PBST contendo uréia. Na quarta lavagem, realizada para as duas séries, utilizou-se PBST. A diferença entre as leituras em absorbância observada na segunda série (absorbância com uréia: AU), em relação à da primeira série (absorbância sem uréia: A) foi expressa em percentagem de queda (%Q)³.

$$\%Q = 100 - \frac{AU \times 100}{A}$$

Para avaliar a concentração de uréia a ser empregada, foram testadas as concentrações de 3M, 6M e 9M em soros de 5 cabras experimentalmente infectadas pelo *Toxoplasma gondii*, sendo oito soros de cada animal, quatro coletados até 50º e quatro após 200 dias de inoculação. Os soros foram ensaiados, com cada concentração de uréia, nas diluições de 1:64, 1:256 e 1:1024.

Análise Estatística

A relação entre o tempo de infecção (animais infectados experimentalmente) e a %Q da absorbância foi analisada através da regressão linear⁶.

As %Q da absorbância obtidas nos três grupos de caprinos naturalmente infectados foram comparadas através da análise de variância⁶.

RESULTADOS

As curvas médias obtidas nos ensaios realizados com diferentes concentrações de uréia e diluições de soros de caprinos experimentalmente infectados pelo *Toxoplasma gondii*, em fases recentes e crônicas, são apresentadas na Fig. 1. Os resultados indicam que a concentração de uréia 9M e a diluição do soro de 1:64 foram as condições que melhor diferenciaram infecções recentes e crônicas.

As curvas mínima, média e máxima da %Q da absorbância, obtidas de soros coletados do 3º ao 500º DAI de cinco cabras experimentalmente infectadas pelo *Toxoplasma gondii* são apresentadas na Fig. 2. A %Q da absorbância decresce até o 100º DAI, tornando-se estável a partir desse período. Os resultados da análise de regressão linear mostram uma correlação de Pearson significativa entre o tempo de infecção e a %Q da absorbância ($r = 0,80$).

Para a análise dos resultados obtidos no grupo de animais naturalmente infectados foi inicialmente realizada uma comparação, por meio do teste da análise de variância, entre as duas coletas dos animais do grupo 3 (considerados crônicos), ficando demonstrado não existir diferença significativa entre elas ($F_{1gl} = 4,42$); sendo assim, para análises posteriores foi considerada a média das duas coletas do grupo 3.

A comparação dos resultados obtidos na segunda coleta do grupo 2 (animais considerados portadores de toxoplasmose crônica) com os resultados da média das duas coletas do grupo 3, por meio da análise de variância, demonstrou não existir diferença significativa entre esses grupos ($F_{1gl} = 3,26$).

Considerando as análises realizadas anteriormente, os animais foram reagrupados em três novas categorias: (A) animais do grupo 1; (B) animais da primeira coleta do grupo 2;

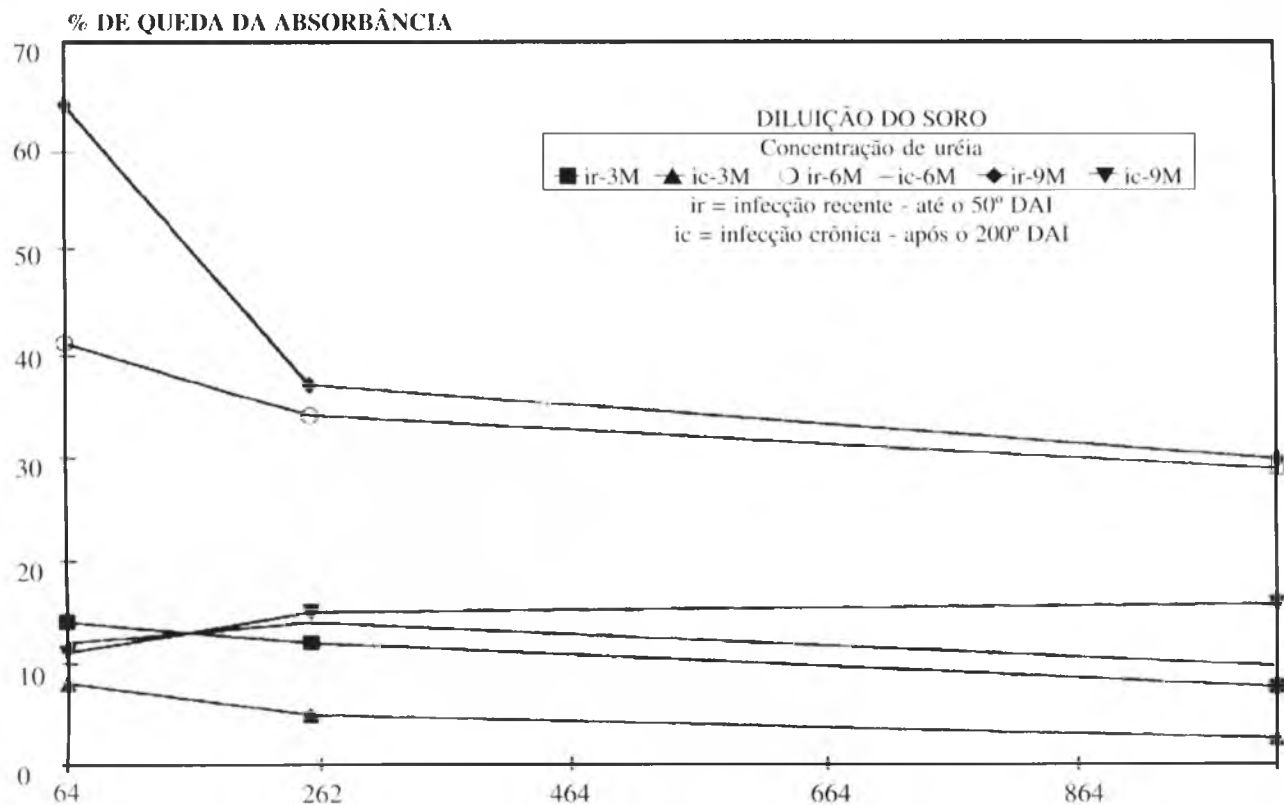


FIGURA 1

Curvas médias da porcentagem de queda da absorbância a 492 nm, pela Reação Imunoenzimática ELISA, após tratamento do complexo Ag - Ac com uréia, nas concentrações de 3M, 6M e 9M, em soros de cinco cabras experimentalmente infectadas pelo *Toxoplasma gondii*. Foram utilizadas oito amostras de soro de cada animal, sendo quatro coletadas até o 50º dia após a infecção (DAI) e quatro após o 200º DAI.

(C) animais da segunda coleta do grupo 2 somados aos do grupo 3 (Fig.3). Esses dados, analisados através do teste de análise de variância, evidenciaram uma diferença significativa entre as %Q da absorbância observadas nos grupos A, B e C ($F_{2,9} = 186,84$). As médias de %Q da absorbância observadas foram $77,61 \pm 13,89$; $46,22 \pm 11,94$; $26,32 \pm 10,84$, para os grupos A, B e C, respectivamente.

Os resultados acima, comparados aos da Fig.2, mostram que a %Q da absorbância obtida nos soros classificados no grupo "A" é semelhante à observada até o 50º DAI. A %Q do grupo "B" corresponderia ao período entre o 50º e o 100º DAI e o do grupo "C" após o 100º DAI de animais inoculados experimentalmente.

DISCUSSÃO

A afinidade de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma*, medida em função da dissociação de pontes de hidrogênio, assume importância na determinação do tempo de vigência da infec-

ção por *Toxoplasma gondii*, podendo ser utilizada como apoio ao diagnóstico de infecções recentes. Ficou demonstrado que em cabras experimentalmente infectadas, o grau de dissociação do complexo Ag - Ac vai diminuindo com o tempo de infecção, tornando-se estável a partir do 100º DAI. A %Q da absorbância em soros provenientes de infecções toxoplásmicas recentes e crônicas, observadas neste experimento, foi superior à observada em estudos sobre toxoplasmose humana³.

Essa diferença provavelmente está relacionada à metodologia utilizada e não a características dos anticorpos anti-*Toxoplasma* humanos e caprinos, pois em outro estudo sobre toxoplasmose humana⁵ foi observado um grau de dissociação mais próximo ao observado neste trabalho. Esta variação provavelmente está relacionada com o número de lavagens do complexo Ag - Ac e com a concentração de uréia empregada nos diferentes trabalhos.

Os dados obtidos em soros de animais naturalmente infectados

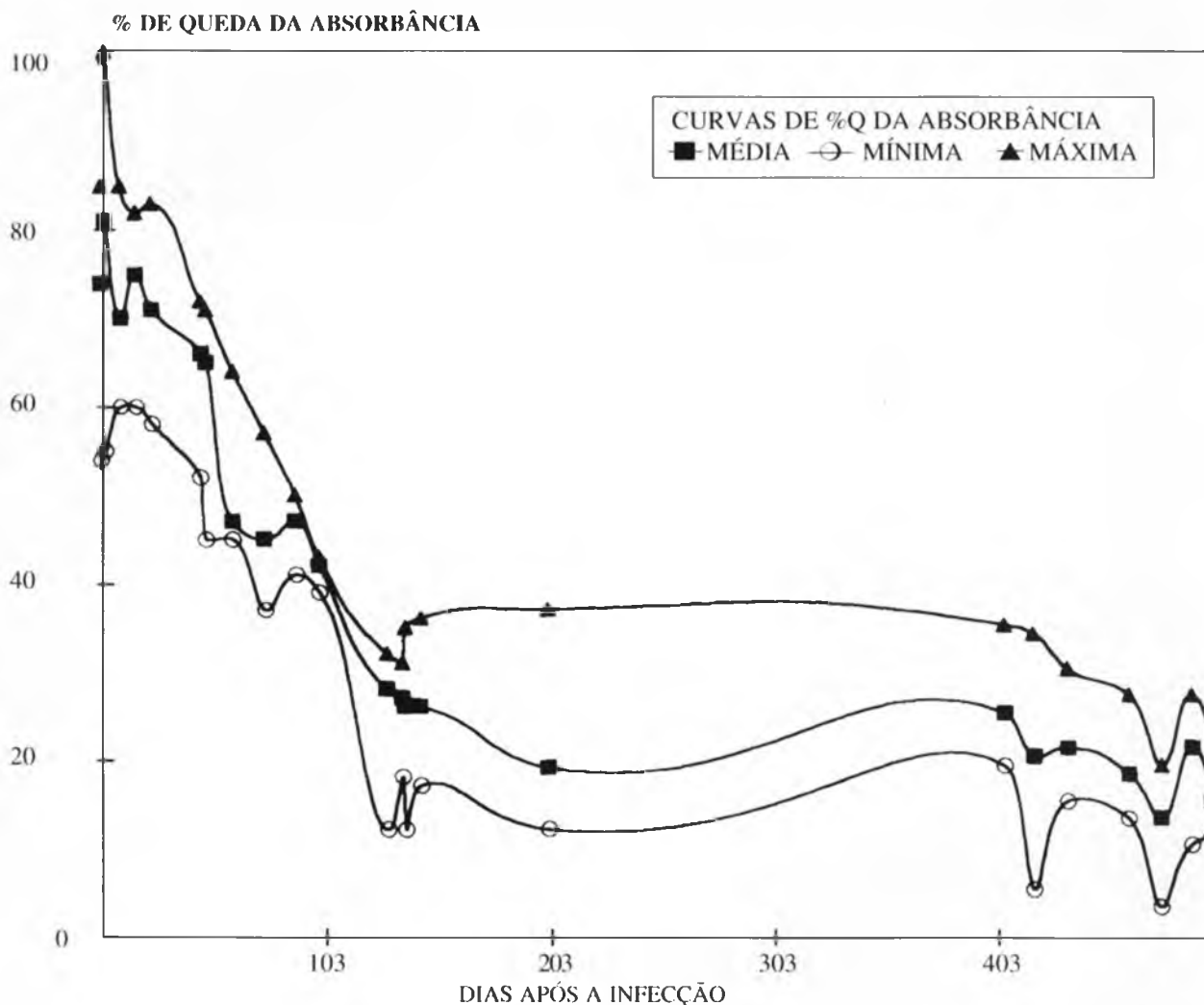


FIGURA 2

Curva média, máxima e mínima da percentagem de queda da absorbância a 492 nm, pela Reação Imunoenzimática ELISA, após tratamento do complexo Ag - Ac com uréia 9M, em soros de cinco cabras experimentalmente infectadas pelo *Toxoplasma gondii*, coletados do 3º ao 500º dia após a infecção.

possibilitaram melhor avaliação da técnica na toxoplasmose caprina, por permitir relacionar a evolução dos níveis de anticorpos IgG com o grau de dissociação do complexo Ag - Ac. Naturalmente, a determinação de avidéz de anticorpos IgG seria uma técnica auxiliar na diferenciação das fases aguda e crônica da toxoplasmose caprina mas, como não existe, atualmente, outro marcador de fase aguda padronizado para esse sistema, essa técnica assume grande importância, podendo ser empregada principalmente na obtenção de inferências em estudos populacionais e como auxiliar em diagnósticos individuais.

Requer, no entanto, estudos mais detalhados, realizados comparativamente a outros marcadores de fase aguda da infecção.

CONCLUSÃO

A determinação da avidéz de anticorpos da classe IgG pode ser utilizada como método auxiliar na determinação da fase de infecção da toxoplasmose caprina, pois:

- em infecções experimentais foi possível demonstrar que a %Q da absorbância decresce com o tempo de infecção;
- em animais naturalmente infectados foi demonstrada relação entre a %Q da absorbância e o "perfil sorológico do animal".

% DE QUEDA DA ABSORBÂNCIA

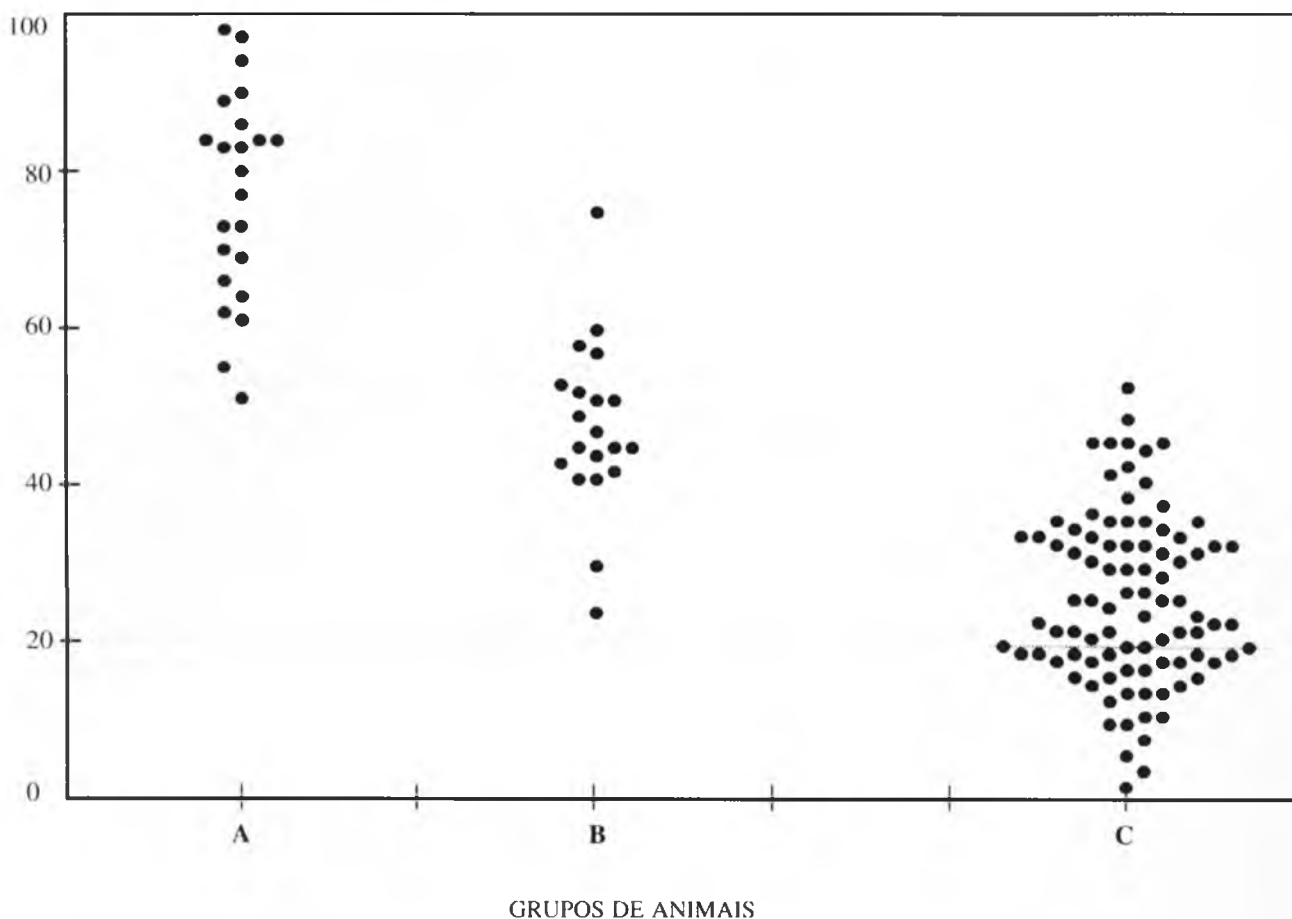


FIGURA 3

Resultados da percentagem de queda da absorvância a 492 nm, pela Reação Imunoenzimática ELISA, após tratamento do complexo Ag-Ac com uréia 9M, em soros de caprinos naturalmente infectados pelo *Toxoplasma gondii*. O grupo A representa os animais com perfil sorológico característico de toxoplasmose recente. No grupo C estão representados os caprinos com perfil de toxoplasmose crônica e no grupo B os com perfil de transição.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Paul Williams pela revisão do texto em inglês.

À sra. Rosálida Estevam Nazar Lopes e ao sr. José Luiz de Faria pelo auxílio técnico.

SUMMARY

For serological characterization of recent *Toxoplasma* infection in goats low avidity IgG specific antibodies were studied. Avidity was evaluated as the decrease of absorbance in ELISA test after treating plates with 3, 6 and 9M urea, as a dissociating solution of low avidity antigen-antibody complexes. A concentration of 9M urea best discriminated between recent and old infections in goats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Absorbance after treating plates with 9M urea decreased in relation to the duration of infection, levelling off about the 100th day after inoculation. In a group of 116 serum samples from naturally infected goats patterns of recent, transitional or chronic toxoplasmosis were demonstrated. Serological patterns were previously determined by immunofluorescent assay. For chronic toxoplasmosis infection, the observed decrease of absorbance was 26.32 ± 10.84 . For recent toxoplasmosis it was 77.61 ± 13.89 , and for transitional pattern, 46.22 ± 11.94 .

UNITERMS: Toxoplasmosis; IgG; Infections; Goats

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W. O laboratório no diagnóstico da toxoplasmose. **Laes-Haes**, v. 61, p. 44-56, 1989.
- 02 - CAMARGO, M.E.; LESER, P.G.; ROCCA, A. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM antitoxoplasma fluorescence tests. A technique for specific results. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.14, p.310-3, 1972.
- 03 - CAMARGO, M.E.; SILVA, S.M.; LESER, P.G.; GRANATO, G.H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcador de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.33, p.213-8, 1991.
- 04 - CHIARI, C.A.; LIMA, J.D.; ANTUNES, C.M.F. Reações de Imunofluorescência Indireta e de Sabin-Feldman na pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.37, p.121-9, 1985.
- 05 - HELDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPAIA, L.; MAKAEÄLA, O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by low avidity of specific IgG. **Journal of Infections Diseases**, v.159, p.736-40, 1989.
- 06 - SNEDECOR, G.M.; COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. 7.ed. Ames, The Iowa State University Press, 1985.
- 07 - THOMAS, H.T.J.; MORGAN-CAPNER, P. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. **Epidemiological Infection**, v.101, p. 591-8, 1988.
- 08 - VITOR, R.W.A. **Infecção experimental de caprinos pelo *Toxoplasma gondii***. Belo Horizonte, UFMG, 1992. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 09 - VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTHTT, A. Enzyme immunoassay in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bulletin of the World Health Organization**, v.53, p.55-65, 1976.

Recebido para publicação em 02/09/93
Aprovado para publicação em 05/04/94