

## PESQUISA DE ANTICORPOS IgM ANTI-TOXOPLASMA GONDII POR MEIO DE TÉCNICA IMUNOENZIMÁTICA REVERSA

José Roberto MINEO (\*), Mário Endsfeldz CAMARCO, Antonio Walter FERREIRA e Gastão ALMEIDA

### RESUMO

Um teste imunoenzimático reverso foi padronizado utilizando-se como fase sólida, microplacas de polivinil sensibilizadas com anticorpos anti-IgM. Estas foram incubadas seqüencialmente com alíquotas de soros de pacientes com suspeita de toxoplasmose aguda, antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*, conjugado peroxidase-F(ab')<sub>2</sub> anti-toxoplasma e substrato enzimático. A atividade enzimática foi determinada por leitura espectrofotométrica, considerando-se como títulos dos soros a máxima diluição fornecendo valores de absorbância maiores que os obtidos com a menor diluição do soro padrão não-reativo. Em 69 amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda, a média geométrica dos títulos no teste ELISA-Reverso IgM foi superior à de todos os outros testes para anticorpos IgM, não se observando resultados negativos falsos devidos a altos títulos de IgG específica. Não foi encontrada, também, reatividade cruzada em nenhuma das 104 amostras de soros de pacientes com outras patologias, inclusive em amostras contendo fator reumatóide IgM.

UNITERMOS: Toxoplasmose — Diagnóstico — Sorologia — Imunoenzimologia reversa.

### INTRODUÇÃO

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose se baseia na correta interpretação de mais de um teste, como a imunofluorescência indireta, hemaglutinação passiva e fixação de complemento<sup>6</sup>. A detecção da fase aguda da infecção foi grandemente facilitada pela introdução de conjugados anti-imunoglobulina M nos testes de imunofluorescência. No entanto, mesmo com a atual disponibilidade desses reagentes, a determinação sorológica da infecção tem encontrado algumas limitações. Resultados positivos falsos podem ocorrer nos soros contendo anticorpos antinucleares ou fator reumatóide<sup>1,2,7</sup>. Reações negativas falsas ou fracamente positivas são verificadas nos soros apresentando altos títulos de anticorpos IgG com alta afinidade an-

ti-toxoplasma, que competem com os anticorpos IgM na fixação aos determinantes antigênicos do parasita durante a primeira fase dos ensaios. Esses problemas têm sido parcialmente resolvidos pela inclusão, nos testes, de etapas que removem tanto o fator reumatóide, por adsorção a suspensões de IgG insolubilizadas pelo glutaraldeído ou agregados pelo calor<sup>1,7</sup>, como as IgG do soro, por adsorção pela proteína A do *Staphylococcus aureus*<sup>8</sup>. Entretanto isto representa a introdução de etapas, envolvendo reagentes com disponibilidade relativamente restrita e de padronização ainda não muito satisfatória, em testes conhecidos exatamente pela sua simplicidade e possibilidade de ampla aplicação.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

(\*) Presente endereço: Departamento de Ciências Fundamentais para a saúde, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil, CEP 38400.

O presente trabalho descreve a aplicação de um teste imunoenzimático reverso para a detecção de anticorpos IgM anti-toxoplasma e estabelece comparação com outros testes sorológicos em termos de sensibilidade e especificidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras de soros

Para o estudo da sensibilidade do teste ELISA-Reverso IgM, foram utilizadas 69 amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda cuja caracterização sorológica foi determinada pelos testes imunofluorescência-IgG, imunofluorescência-IgM, fixação de complemento e hemaglutinação passiva, como descrito por CAMARGO & col.<sup>6</sup>. Estas amostras tinham sido também submetidas a outros testes sorológicos, como os testes imunoenzimáticos ELISA-IgG e ELISA-IgM com antígeno protéico<sup>4</sup> e com antígeno polissacarídico<sup>12</sup>. No estudo da especificidade do teste ELISA-Reverso IgM foram empregadas 104 amostras de soros de pacientes apresentando patologias diversas. Todas as amostras de soros tinham sido inativadas a 56°C por 30 minutos e estavam armazenadas a -20°C em glicerina neutra (E. Merck, Darmstadt), volume a volume, por um período compreendido entre 6 e 24 meses.

### Obtenção e purificação do anti-soro anti-IgM humana

As imunoglobulinas da classe IgM, obtidas a partir do soro de paciente com mieloma M, foram isoladas segundo método descrito por MICHELI & ISLIKER<sup>11</sup>. Escolheu-se para inoculação um carneiro que recebeu inicialmente 4 doses semanais de emulsão contendo 2 mg de IgM e adjuvante completo de Freund, por via subcutânea, seguidas por mais 4 doses semanais de solução contendo 5 mg de IgM, sem adjuvante, por via intramuscular. A purificação do soro de carneiro imunizado com IgM humana foi realizada por absorção com polímero de IgG humana, segundo a técnica descrita por AVRAMEAS & TERNYNCK<sup>3</sup>.

### Obtenção do antígeno solúvel

O antígeno solúvel do *Toxoplasma gondii*, cepa RH, empregado no teste imunoenzimático

reverso foi obtido segundo o mesmo processo descrito por CAMARGO & col.<sup>6</sup>.

### Preparo do conjugado imunoenzimático

O conjugado imunoenzimático utilizado consistiu do produto de ligação entre a peroxidase e o fragmento F(ab')<sub>2</sub> da IgG de coelhos imunizados com *T. gondii*. O método de conjugação empregado foi o de WILSON & NAKANE<sup>14</sup>, utilizando-se enzima e digesto pepsínico na relação ponderal 1:1.

### Padronização dos testes

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados em placas de polivinil (Plásticos Amplia Ind. Com. Ltda., SP) sendo as superfícies plásticas sensibilizadas por meio de incubação de 18 horas a 4°C com a fração IgG do soro de carneiro imunizado com IgM humana, diluída em tampão carbonato 0,06M pH 9,6. As placas sensibilizadas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS-Tween 20 e incubadas com os soros testes e soros padrões nas diferentes diluições, variando de 1/16 a 1/262144. Após incubação de 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas em PBS-Tween 20 e incubadas com antígeno solúvel de *T. gondii* por 1 hora a 37°C. Após lavagens em PBS-Tween 20, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com o conjugado imunoenzimático. Adicionou-se, então, após nova série de lavagens, o substrato revelador formado por solução de peróxido de hidrogênio 1,5 mM e ácido 5-aminossalicílico 5,2 mM, sendo o produto formado quantificado por leitura espectrofotométrica a 450 nm.

## RESULTADOS

### Titulação dos reagentes no ensaio imunoenzimático

O efeito das diferentes concentrações do antígeno de toxoplasma em função das diferentes quantidades do anti-soro anti-IgM, fixadas em fase sólida, está representado na Fig. 1. Observou-se que o anti-soro utilizado na concentração protéica de 100 µg/ml não difere significativamente do utilizado na concentração de 300 µg/ml, optando-se pela solução mais diluída. A concentração considerada ótima do antígeno foi a de 200 µg/ml. Através da titulação em bloco, verificou-se que o título ótimo observado para o conjugado foi 1/200, considerando-se também a concentração do antígeno de 200 µg/ml.

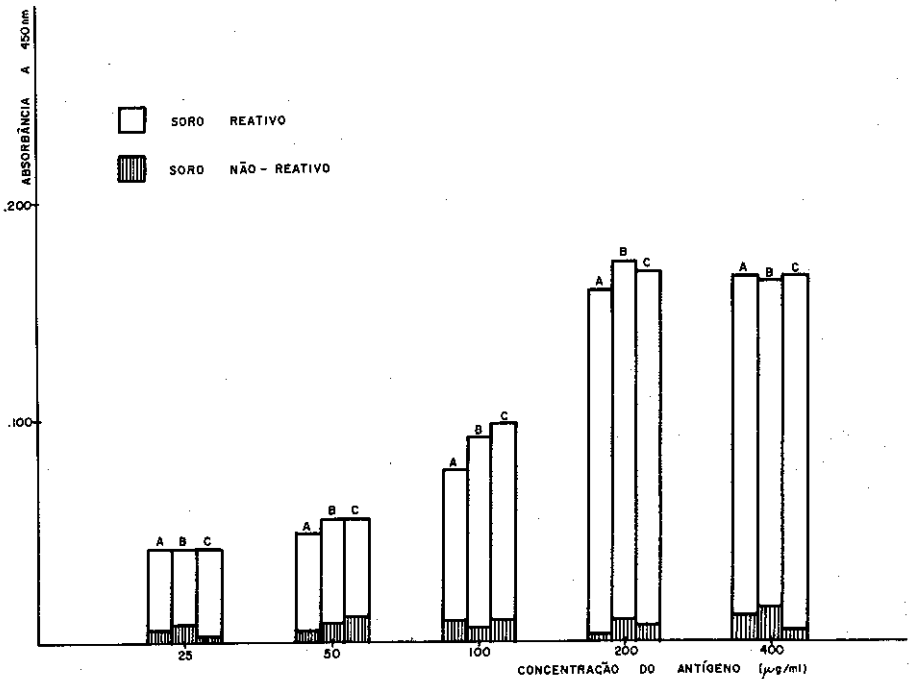


Fig. 1 — Efeito das diferentes concentrações protéicas do antígeno de Toxoplasma em função de diferentes quantidades de anti-IgM fixadas em fase sólida, no teste ELISA-Reverso IgM. A, B e C representam concentrações de, respectivamente, 100, 200 e 300  $\mu\text{g/ml}$  do anti-soro.

### Resultados comparativos do teste ELISA-Reverso IgM com outros testes sorológicos

Na Fig. 2 está representada a distribuição de títulos do teste ELISA-Reverso IgM nas amostras estudadas em comparação com os outros testes sorológicos para anticorpos IgM. A média geométrica dos títulos no teste ELISA-Reverso IgM foi superior à de todos os outros testes, sendo esta diferença estatisticamente significativa pelo teste de Student (Tabela I). Não foi observada concordância entre os títulos dos testes por meio do coeficiente Kappa, embora fosse encontrada correlação entre eles por meio do coeficiente de Pearson.

### Especificidade do teste ELISA-Reverso IgM

A especificidade do teste ELISA-Reverso IgM foi verificada testando-se 104 amostras de soros provenientes de pacientes com patologias diversas. Desse total, 27 amostras eram de pacientes com toxoplasmose crônica. Na Tabela II estão indicadas as médias das absorbâncias e os desvios-padrão obtidos em comparação com as 69 amostras de soros com toxoplasmose agu-

da. Não foi encontrada reatividade cruzada em nenhuma das amostras estudadas.

### DISCUSSÃO

A identificação das classes de imunoglobulinas antitoxoplasma é de muita importância tanto nas infecções recentes como nas formas congênitas da toxoplasmose. A detecção dos anticorpos IgM anti-toxoplasma representa marcador sorológico importante, desde que a presença desses anticorpos pode ser utilizada para diferenciar infecções agudas das crônicas. Um aumento dos títulos hemaglutinantes equiparando-os aos títulos do teste imunofluorescência-IgG, assim como a negatização do teste imunofluorescência-IgM, representam marcadores sorológicos entre a toxoplasmose aguda e um estágio transicional dessa infecção, como observado por CAMARGO & LESER<sup>5</sup>.

O teste ELISA-Reverso para a detecção de anticorpos IgM anti-toxoplasma se comportou como um teste sensível e específico. Das 69 amostras de soros com toxoplasmose aguda estudadas, o teste ELISA-Reverso IgM apresentou títulos sistemática e significativamente

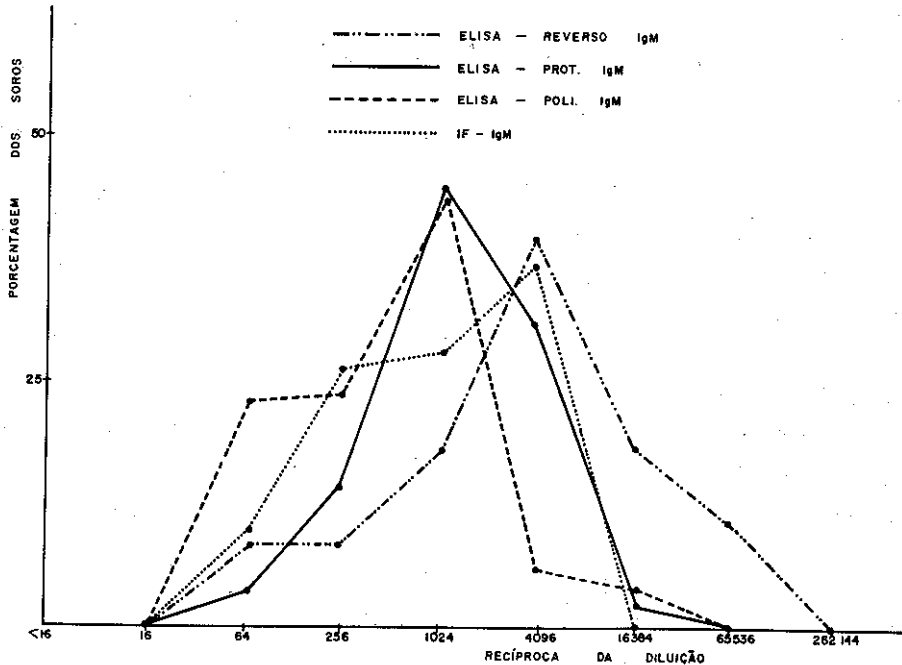


Fig. 2 — Resultados comparativos entre os títulos dos testes ELISA-Reverso IgM, ELISA-IgM com antígeno polissacarídico (ELISA-Poli. IgM), ELISA-IgM com antígeno protéico (ELISA-Prot. IgM) e Imunofluorescência-IgM (IF-IgM) em 69 amostras de soros de pacientes com toxoplasmose "aguda".

TABELA I

Valores das médias geométricas dos títulos codificados (MGTC) e teste "t" de Student para a determinação da significância das diferenças entre elas, nos diversos testes sorológicos

Teste	MGTC
ELISA-Reverso IgM	786,88
ELISA-Prot. IgM	310,83
ELISA-Poli. IgM	126,24
Imunofluorescência - IgM	235,57

Comparação	Valor "t" calculado(*)
ELISA-Reverso IgM x ELISA-Prot. IgM	3,19
ELISA-Reverso IgM x ELISA-Poli. IgM	6,60
ELISA-Reverso IgM x Imunofl. - IgM	4,35

(\*) Valor de "t" crítico (para  $\alpha \leq 0,05$ ; 136 graus de liberdade) = 1,98, quando "t" calculado > "t" crítico = há significância nas diferenças das médias

TABELA II

Determinação da especificidade do teste ELISA-Reverso IgM em amostras de soros apresentando patologias diversas (diluição 1/16)

Soros de pacientes com	N.º de Amostras	Médias das Absorbâncias a 450 nm e Desvios - Padrão
Doença de Chagas	10	.006 ± .004
Fator Reumatóide	37	.007 ± .005
Fator Anti-núcleo	3	.003 ± .003
Calazar	2	.005 ± .005
Leishmaniose Tegumentar	5	.012 ± .007
Sífilis	6	.007 ± .005
Mononucleose infecciosa	3	.005 ± .004
Malária	7	.006 ± .004
Esquistosomose	2	.000 ± .000
Brucelose	2	.005 ± .000
toxoplasmose crônica	27	.006 ± .005
Toxoplasmose "aguda"	69	.131 ± .057

maiores do que aqueles obtidos com outros testes para anticorpos da classe IgM. Além disso, em 7 dessas amostras de soros, a positividade dos testes convencionais para anticorpos IgM, inclusive a do teste ELISA-IgM com antígeno polissacarídico, somente foi possível após a remoção dos anticorpos IgG por passagem em coluna de proteína A ou absorção em suspensão de *Staphylococcus aureus*. O teste ELISA-Reverso IgM, no entanto, não necessitou da se-

paração dos anticorpos IgG para a positividade dessas 7 amostras de soros. Isto pode ser explicado pelo fato de que na primeira etapa do ensaio, como o imunoadsorvente só tem afinidade para as imunoglobulinas M, os anticorpos IgG não competem pelos determinantes antigênicos do toxoplasma. Por outro lado, resultados positivos falsos que são freqüentemente observados nos soros com fator reumatóide, não foram encontrados no teste ELISA-Reverso

IgM e isto se deve à utilização do conjugado empregando fragmento F(ab')<sub>2</sub>, ao invés da imunoglobulina íntegra que foi utilizado por NAOT & REMINGTON<sup>13</sup>. A conjugação direta do antígeno com a peroxidase, como preconizado por FRANCO & col.<sup>10</sup>, abreviando o teste imunoenzimático em uma etapa, representa uma excelente variante técnica. No entanto, como demonstrado por estes mesmos Autores<sup>9</sup>, dependendo da escolha do método de conjugação, pode resultar em moléculas antigênicas com diferentes graus de marcação, o que ocasiona testes não-reprodutíveis além de aumentar a intensidade de coloração normalmente encontrada nos controles da reação. Ao contrário, pudemos observar que a marcação do fragmento F(ab')<sub>2</sub> resulta em controles do teste com intensidade de coloração significativamente menores, o que propicia, inclusive, a determinação dos títulos dos soros por simples leitura visual.

Em vista dos resultados obtidos concluímos que, no que diz respeito à detecção de anticorpos IgM como marcador sorológico importante na caracterização da toxoplasmose aguda, a técnica imunoenzimática reversa foi, dentre as técnicas estudadas, aquela que apresentou resultados mais satisfatórios, levando-se em consideração suas propriedades de sensibilidade e especificidade.

### SUMMARY

#### Reverse IgM enzyme-linked immunosorbent assay (Reverse IgM-ELISA) for toxoplasmosis serodiagnosis

A Reverse IgM enzyme — linked immunosorbent assay (Reverse-IgM ELISA) was described in which polyvinyl microplates were sensitized with anti-immunoglobulin M (IgM) antibodies and then sequentially allowed to react with patient's serum, *Toxoplasma gondii* soluble antigen, peroxidase — labeled specific F(ab')<sub>2</sub> fragment and substrat. Measurement of activity of the solid phase bound enzyme conjugate was done by spectrophotometric reading of the final developed color. In a group of 69 sera samples from individuals with recently acquired toxoplasmosis, Reverse-IgM ELISA was positive in every case, showing higher geometric mean titer than others conventional serological tests. Furthermore false-negative IgM samples presented positive Reverse-IgM ELISA

results even without adsorption with *Staphylococcus aureus* protein A. In a group of 104 sera samples from individuals with others pathologies, no interference was observed, even in the false-positive IgM samples due to the presence of IgM rheumatoid factor.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMBROISE-THOMAS, P.; FRANCESIO, J.; SIMON, J.; MICOUIN, C. & PIERSON, Y. — Les facteurs rhumatoïdes. Cause de non-especificité de l'immunofluorescence anti-IgM dans la toxoplasmose. *Ann. Biol. Clin.* 38: 315-319, 1980.
2. ARAÚJO, F. G.; BARNETT, E. V. & GENTRY, L. O. — False-positive antitoxoplasma fluorescent-antibody tests in patients with antinuclear antibodies. *Appl. Microbiol.* 22: 270-275, 1971.
3. AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T. — The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry* 6: 53-66, 1969.
4. 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. & Immunity* 21: 55-58, 1978.
5. CAMARGO, M. E. & LESER, P. G. — Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II. Evolutionary 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: 227-238, 1976.
6. 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 3,752 serum samples. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18: 215-226, 1976.
7. CAMARGO, M. E.; LESER, P. G. & ROCCA, A. — Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-toxoplasma fluorescent tests. A technique for specific results. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14: 310-313, 1972.
8. CHANTLER, S.; DEVRIES, E.; ALLEN, P. R. & HURN, 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 adsorbents. *J. Immunol. Meth.* 13: 367-380, 1976.
9. FRANCO, E. L.; WALLS, K. W. & SULZER, A. J. — Reverse enzyme immunoassay for detection of specific antitoxoplasma immunoglobulin M antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 13: 859-864, 1981.

10. FRANCO, E. L.; WALLS, K. W.; SULZER, A. J. & SOTO, J. C. — Diagnosis of acute acquired toxoplasmosis with the enzyme — labelled antigen Reversed immunoassay for immunoglobulin M antibodies. *J. Immunoassay* 4: 373-393, 1983.
11. MICHELI, A. & ISLKER, H. — Cleavage of Gamma-M-globulin by means of reducing enzyme systems. *Immunochemistry* 3: 385-392, 1966.
12. MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E. & FERREIRA, A. W. — Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. *Infect. & Immun.* 27: 283-287, 1980.
13. NAOT, Y & REMINGTON, J. S. — An enzyme-linked immunosorbent assay in detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 142: 757-766, 1980.
14. WILSON, M. B. & NAKANE, P. K. — Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: KNAFF, W.; HOLUBAR, K. & WICK, G. ed. *Immunofluorescence and Related Techniques*. Amsterdam, North-Holland Biomedical, 1978, pág. 215.

Recebido para publicação em 28-2-1985.