

Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta

Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay ELISA to detect anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgG antibodies, and comparison with the indirect immunofluorescence technique

Cláudia Maria Antunes Uchôa¹, Rosemere Duarte², Valmir Laurentino-Silva², Giani Maria Coutinho Alexandre³, Humberto Gomes Ferreira³ e Maria Regina Reis Amendoeira³

Resumo A sorologia tem sido o método de escolha para o diagnóstico da toxoplasmose. Devido a isto, padronizamos um ensaio imunoenzimático (ELISA) e comparamos seus resultados com a técnica de imunofluorescência indireta (IFI). A técnica padronizada apresentou na pesquisa de IgG sensibilidade (S) de 96,7% e especificidade (E) de 75%, com valor de predição de positividade (VPP) de 83,3% e de negatividade (VPN) de 94,7%, com uma concordância ajustada (K) de 73,5%. A IFI apresentou S de 83,8%, E de 79,1% com VPP de 83,8% e VPN de 79,1% com K de 63%. A concordância bruta entre os dois testes (ELISA/IFI) foi de 88,3% para pesquisa de IgG e de 81,5% para pesquisa de IgM, sendo o K de 70,8% para IgG e de 1,3% para IgM, sendo o índice de correlação (r) de 0,556 para IgG e de -0,023 para IgM. Podemos concluir que a ELISA-IgG padronizada é indicada nos processos de triagem sorológica, sendo a ELISA-IgM desaconselhada uma vez que apresentou baixos índices de concordância ajustada com a técnica de referência, sugerindo pouca confiabilidade dos resultados.

Palavras-chaves: ELISA. Imunofluorescência. *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmose. Sorologia. Diagnóstico.

Abstracts Serology has been the most popular method to diagnose toxoplasmosis. Accordingly, this study standardizes an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and compares its results with the IFI technique. In the IgG detection test, the standardized technique presented a sensibility (S) of 96.77%, a specificity (SP) of 75%, with a positive predictive value (PPV) of 83.33%, a negative predictive value (NPV) of 94.74%, and an adjusted concordance (K) of 73.50%. The IFI exhibited 83.87% for S, 79.16% for SP, 83.81% for PPV, 79.16% for NPV, and 63% for K. The rough concordance between these two tests (ELISA/IFI) was 88.35% for the IgG detection test and 81.55% for the IgM detection test. K was 70.82% and 1.31% for IgG and IgM, respectively, the correlation index (r) being 0.556 for IgG and -0.023 for IgM. We can conclude that standardized ELISA-IgG is indicated in serologic selection processes, whereas the ELISA-IgM is not recommended for presenting low values for the adjusted concordance with the reference technique, which suggests not very reliable results.

Key-words: ELISA. Immunofluorescence test. *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmosis. Serology. Diagnosis.

1. Disciplina de Parasitologia. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Instituto Biomédico. Universidade Federal Fluminense/FIOCRUZ; 2. Departamento de Ciências Biológicas. Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ e 3. Laboratório de Protozoologia. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Endereço para correspondência: Dr^a Claudia Maria Antunes Uchôa. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Instituto Biomédico/ Universidade Federal Fluminense. R. Professor Hernani de Mello 101, São Domingos, 24210-130 Niterói, RJ, Brasil.

Fax: 55 21 6205266

E-mail: uchoa@radnet.com.br

Recebido para publicação em 18/8/98.

A toxoplasmose é uma infecção cosmopolita, cujo agente etiológico é o *Toxoplasma gondii*²² apresentando alta prevalência na população humana. O diagnóstico clínico torna-se difícil por ser um processo sistêmico, com baixa parasitemia e sintomas e sinais clínicos genéricos o que leva a confusão com outras afecções de etiologias diversas, necessitando de técnicas laboratoriais para sua confirmação^{1 25}. O diagnóstico parasitológico não é realizado com facilidade por necessitar de laboratórios e técnicos especializados, apresentar demora na obtenção de resultados (isolamento)¹³, e em alguns casos apresentar metodologias baseadas na biologia molecular de custo elevado²⁵.

Atualmente, a metodologia mais utilizada para o diagnóstico da toxoplasmose consiste na pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG, a fim de que se possa estabelecer a fase de infecção, embora já esteja sendo usado a detecção de IgA^{24 31} como indicador de fase aguda. Diversas técnicas sorológicas tem sido empregadas no diagnóstico da toxoplasmose com grande eficiência e rapidez como podemos citar a técnica de Sabin-Feldman²⁷; a imunofluorescência indireta (IFI)^{9 12 29}, a hemaglutinação (HA)¹⁶; a fixação de complemento (FC)⁹, a *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)^{8 28} e a

immunosorbent agglutination assay (ISAGA)^{3 15}.

Vários autores^{9 11 28} têm comparado as técnicas de IFI, ELISA e FC verificando boa concordância entre os resultados e sugerem que a técnica de ELISA, em futuro próximo, poderá substituir a técnica de IFI. Por outro lado, Van Knapen³³ relata que muitas vezes observam-se que a concordância entre os resultados obtidos por IFI e ELISA não é absoluta e sugere que estas diferenças sejam devidas ao uso de antígenos distintos — íntegro na IFI e solúvel na ELISA — detectando, neste último, anticorpos de aparecimento mais tardio além da diferença de qualidade entre os fabricantes de conjugados fluorescentes e enzimáticos³³.

Neste trabalho propusemo-nos a padronizar uma ELISA avaliando suas qualidades fixas (Sensibilidade, Especificidade, Concordância Ajustada) e variáveis (Valor de Predição de Positividade e Valor de Predição de Negatividade)³² e comparar os resultados com a técnica de IFI na pesquisa de anticorpos da classe IgG e IgM em quatro grupos de indivíduos (indivíduos considerados normais, pacientes com clínica sugestiva de toxoplasmose, gestantes e pacientes infectados pelo vírus causador da síndrome da imunodeficiência adquirida — HIV com sorologia para toxoplasmose).

MATERIAL E MÉTODOS

Os soros utilizados foram colhidos de 103 indivíduos do Rio de Janeiro, sendo 28 pacientes do setor de infectologia do Hospital Evandro Chagas (HEC) com clínica sugestiva de toxoplasmose e considerados imunocompetentes por não possuírem histórico de comprometimento do sistema imunitário (grupo A), 30 gestantes do setor de pré-natal do Instituto Fernandes Figueira (IFF) (grupo B), 28 pacientes em diferentes fases de infecção pelo HIV e com sorologia positiva pela IFI para toxoplasmose (grupo C) e 17 indivíduos considerados *normais* por não apresentarem nenhuma alteração sugestiva de infecção (grupo D, para obtenção de parâmetros para cálculo de *cutoff* e avaliação das qualidades fixas e variáveis das técnicas sorológicas utilizadas.

Imunofluorescência Indireta (IFI). Utilizou-se a reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)⁹, sendo o antígeno produzido no laboratório, utilizando a cepa de *T. gondii* (amostra cedida pelo Dr. Isnard Teixeira à Escola Nacional de Saúde Pública e mantida no laboratório de Imunidade Celular e Humoral - Instituto Oswaldo Cruz) a partir

de lavado peritoneal de camundongos *Swiss Webster* previamente inoculados, seguida de três lavagens com solução salina tamponada 0.01M pH 7.2 (PBS) sob centrifugação a 700g/10 minutos e conservados a temperatura de 4° a 8°C. A técnica foi realizada com os soros diluídos em solução salina tamponada 0.01M pH 7.2 (PBS), ao quádruplo, a partir de 1:16 até 1:4096. A partir daí, as diluições eram feitas ao dobro. Foi usado soro conjugado fluorescente anti-humano na diluição de 1:50 tanto para os conjugados anti-IgM quanto anti-IgG humano (conjugado anticadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA).

Todos os soros IgM positivos foram passados em coluna de Sepharill S-100HR (Pharmacia-Biotech) e submetidos a pesquisa de fator reumatóide com o *kit* de diagnóstico Biolatex - RF (Biocientífica SA).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay — ELISA. Preparo do antígeno: o antígeno foi obtido do exsudato peritoneal de camundongos infectados com a mesma cepa de *T. gondii*

utilizada para IFI. O exsudato foi centrifugado a 40g/10 minutos, para separação das células do hospedeiro. Este sobrenadante foi centrifugado a 700g/10 minutos e o sedimento rico em parasitas suspenso em PBS estéril e centrifugado a 700g/10 minutos, repetindo-se a operação mais uma vez para lavar o antígeno. Após esta última centrifugação o sedimento foi suspenso em uma pequena quantidade de PBS estéril (cerca de 0,5ml), e procedeu-se a quebra dos parasitas pela técnica de congelamento rápido com metanol e gelo seco e descongelamento em banho-maria a 56°C, até não se obter parasitas íntegros através da visualização de parte do material em microscopia óptica. A seguir o material foi centrifugado à 12000g/5 minutos para separação do antígeno solúvel. Fez-se então dosagem da proteína¹⁹ e padronização da concentração ideal de proteínas, através de soros padrões reagente e não reagente, sendo o material aliquoteado e congelado a -20°C para posterior diluição em tampão carbonato bicarbonato pH 9,0, na sensibilização das placas³³.

Procedimento técnico: utilizou-se placas de poliestireno com 96 poços de fundo plano (Corning-Sigma), sensibilizadas com 100ml de antígeno a 1,25µg/ml por poço, diluído em tampão carbonato bicarbonato pH 9,0. Após incubação a 4°C *overnight* a placa foi lavada duas vezes com PBS Tween 0,05% (PBS-T) e adicionou-se o soro diluído ao quádruplo, a partir de 1:16 até 1:4096, em solução de leite desnatado (Molico) 1% em PBS-T para bloqueio, colocando-se 100µl de cada diluição nos respectivos poços. A placa foi então incubada à 37°C/45 minutos em câmara úmida, sendo lavada três vezes com PBS-T. Colocou-se o soro conjugado com peroxidase (SIGMA) previamente titulado anti-IgM ou anti-IgG humano, submetendo-se a placa a nova incubação a 37°C por 45min em câmara úmida. Ao seu término, fez-se 3 lavagens (três) em lavadora automática e acrescentou-se 100ml de solução reveladora com substrato (tampão fosfato citrato pH 3,5 com 0,01g de ortofenilenodiamina (OPD) e peróxido de hidrogênio - Merck 30%), colocando-se a placa em câmara escura por 15min. Após este período, fez-se leitura no leitor *EIA Microplate Reader da SIGMA Diagnóstico* com comprimento de onda de 490-650 nanômetros.

Estabelecimento do *cutoff*: O estabelecimento do *cutoff* foi realizado a partir da análise de doze soros padrão negativos e quatro positivos em

quatro placas distintas, frente a determinada partida de antígeno. Foi obtido um *cutoff* de cada placa a partir da média das leituras dos soros negativos adicionado de dois desvios-padrão. Com a finalidade de uniformizar os valores de *cutoff* foi estimado um fator de correção pela divisão da média dos valores de *cutoff* pela média das leituras dos soros padrão negativos destas placas¹⁸. No estudo os soros foram diluídos de 1:16 até 1:4096 para pesquisa de IgG e de 1:16 até 1:256 para pesquisa de IgM, sendo considerado como *cutoff* de cada placa a média da leitura da diluição de 1:16 dos soros negativos, multiplicado pelo fator de correção, pois verificou-se que as diferenças entre os *cutoff* por diluição foram irrelevantes.

Análise estatística: Testes para avaliação de Sensibilidade (S), Especificidade (SP), Confiabilidade (C), Valor de Predição de Positividade (VPP), Valor de Predição de Negatividade (VPN) e Valor de Concordância Ajustada (K) foram realizados no tratamento dos resultados obtidos através das técnicas sorológicas^{14 19 29 32}.

Para avaliação da Sensibilidade, Especificidade, Confiabilidade, Valor de Predição de Positividade, Valor de Predição de Negatividade e Valor de Concordância Ajustada foram estabelecidos dois grupos, sendo um constituído por 31 amostras de soros reagentes para IgG anti *T. gondii* (28 pacientes com clínica sugestiva para toxoplasmose e três pacientes em que ocorreu o isolamento) e um segundo grupo constituído por 24 amostras de soros considerados não-reagentes de pacientes sem suspeita clínica (17 pacientes do grupo D e 7 pacientes do grupo B com IgG e IgM negativos).

Devido ao pequeno número de soros reagentes para IgM confiáveis não foi possível determinar as qualidades fixas e variáveis da técnica de ELISA IgM e IFI IgM.

Além destas avaliações, das técnicas individualmente, foram realizadas a análise da copositividade, da conegatividade e o grau de concordância bruta e ajustada entre as duas técnicas estudadas¹⁸.

A fim de que fosse feita a comparação dos resultados obtidos pela técnica de ELISA dos soros analisados nas diversas placas (valores de *cutoff* diferentes); utilizou-se a fórmula da unidade arbitrária "Y", através da qual os *cutoff* das diversas placas puderam ser igualados ao valor numérico 5, sendo considerados positivos

os soros com valores superiores a este e como negativos os soros com valores numéricos inferiores a 5 ($Y = [(AB - C) \times F] + 5$ onde AB = valor da absorvância da amostra, C = valor da *cutoff*, F = fator que é calculado $F = 95/2 - C$). A partir dos dados obtidos foi analisada a correlação entre os resultados obtidos por títulos, através das técnicas de ELISA e IFI, para pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM e a

correlação entre o título obtido pela técnica de ELISA e a unidade arbitrária (Y) obtida por esta mesma técnica.

Foram utilizados o índice de correlação de Pearson (r) e o teste de qui-quadrado (χ^2) para análise dos resultados obtidos através do MINITAB/WIN (programa para análise estatística) e tomando como base Levin¹⁹ e Berquó et al⁴ e Sounis²⁹.

RESULTADOS

A técnica de ELISA IgG, padronizada, apresentou 96,7% de sensibilidade e especificidade de 75%, com confiabilidade de 87,2%. O VPP do teste foi de 83,3%, enquanto que o VPN foi de 94,7% sob prevalência estimada em 78,6%. O valor de concordância ajustada foi de 73,5%, sendo considerado regular.

A técnica de IFI-IgG apresentou S de 83,8% e E de 79,1% e confiabilidade de 81,8%. O VPP foi de 83,8% e o VPN de 79,1%. O valor de K foi de 63%, sendo considerado regular.

No grupo A, dos 28 pacientes com clínica sugestiva para toxoplasmose, apenas 4 (14,2%)

foram positivos pela técnica de ELISA-IgM, porém com leituras muito próximas ao valor de *cutoff* da reação. A técnica de IFI-IgM não apresentou resultados positivos. Os soros que apresentaram resultados positivos pela IFI-IgM (6 - 21,4%) mostraram-se negativos pela técnica de ELISA.

Nas Tabelas 1 e 2, estão representados os soros reatores nos dois testes, sendo a copositividade e a conegatividade da resposta a cada teste em relação ao outro, de forma pareada, também representadas nas Tabelas 1 e 2. A concordância bruta das respostas aos dois

Tabela 1 - Resultados obtidos com os soros de pacientes dos quatro grupos avaliados obtidos pelas técnicas de ELISA e IFI para pesquisa de anticorpos da classe IgG.

IFI	ELISA		Total
	positivo	negativo	
Positivo	70	2	72
Negativo	11	20	31
Total	81	22	103

Conegatividade IFI/ELISA = 67,7%; Copositividade ELISA/IFI = 86,4%; Copositividade IFI/ELISA = 97,2%; Conegatividade ELISA/IFI = 95,4%; Concordância Bruta = 88,3%; K = 70,8%.

Tabela 2 - Resultados obtidos com os soros de pacientes dos quatro grupos avaliados obtidos pelas técnicas de ELISA e IFI para pesquisa de anticorpos da classe IgM.

IFI	ELISA		Total
	positivo	negativo	
Positivo	1	5	6
Negativo	14	83	97
Total	15	88	103

Copositividade ELISA/IFI = 6,6%; Conegatividade IFI/ELISA = 85,5%; Copositividade IFI/ELISA = 16,6%; Concordância Bruta = 81,5%; Conegatividade ELISA/IFI = 94,3%; K = 1,31%.

testes estudados foi de 88,3% para a pesquisa de IgG e de 81,5% para a pesquisa de IgM. Estimando-se o índice de concordância ajustada (K) encontrou-se, K = 70,8% e K = 1,3% para IgG e IgM, respectivamente. Considerando-se o critério de concordância, 74% > K > 41%, os testes

foram avaliados como de nível regular de concordância, para pesquisa de IgG e de nível pobre de concordância para pesquisa de IgM.

Na Tabela 3, pode-se observar os resultados dos 28 pacientes do grupo A pelas técnicas de ELISA e IFI para pesquisa de IgG.

Tabela 3 - Resultados da sorologia de 28 pacientes, com clínica sugestiva de toxoplasmose aguda, obtidos através das técnicas de ELISA e IFI para pesquisa de anticorpos da classe IgG. Grupo A.

Métodos	Soros não reagentes	Soros reagentes	Títulos dos soros reagentes				
			1:16	1:64	1:256	1:1024	1:4096
IFI	4/28	24/28	3/24	5/24	4/24	8/24	4/24
%	14,2	85,7	12,5	20,8	16,7	33,3	16,7
ELISA	2/28	26/28	1/26	2/26	4/26	9/26	10/26
%	7,1	92,8	3,8	7,6	15,3	34,6	38,4

A pesquisa de IgM revelou 22 (78,5%) soros não reagentes e 6 (21,4%) reagentes dos quais apenas 1 (16,6%) apresentou sorologia reagente a 1:16, 2 (33,4%) até 1:64 e 3 (50%) até 1:256. Pela técnica de ELISA 23 (82,1%) soros foram

negativos enquanto 5 (17,8%) foram positivos. Destes 4 (80%) reagiram até 1:16, enquanto apenas 1 (20%) reagiu até 1:64.

Com relação ao grupo B, os resultados da pesquisa de IgG estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da sorologia de 30 pacientes, gestantes, obtidos através das técnicas de ELISA e IFI para pesquisa de anticorpos das classes IgG. Grupo B.

Métodos	Soros não reagentes	Soros reagentes	Títulos dos soros reagentes				
			1:16	1:64	1:256	1:1024	1:4096
IFI	13/30	17/30	6/17	7/17	3/17	1/17	0/17
%	43,3	56,6	35,2	41,1	17,6	5,8	0
ELISA	7/30	23/30	5/23	7/23	6/23	3/23	2/23
%	23,3	76,6	21,7	30,4	26,0	13,0	8,6

Todas as pacientes do grupo B foram não-reagentes pela técnica de IFI-IgM; enquanto pela ELISA 28 (93,3%) das pacientes foram não reagentes e 2 (6,6%) foram reagentes com títulos iguais a 1:16.

Os resultados do grupo C, quanto a presença de anticorpos das classes IgG estão apresentados na Tabela 5.

Na IFI-IgM todos os soros foram não-reagentes, sendo que pela técnica de ELISA 21

Tabela 5 - Resultados da sorologia de 28 pacientes, com infecção por HIV e sorologia para toxoplasmose, obtidos através das técnicas de ELISA e IFI para pesquisa de anticorpos da classe IgG. Grupo C.

Métodos	Soros não reagentes	Soros reagentes	Títulos dos soros reagentes				
			1:16	1:64	1:256	1:1024	1:4096
IFI	3/28	25/28	3/25	9/25	4/25	9/25	0/25
%	10,7	89,2	12	36	16	36	0
ELISA	2/28	26/28	6/26	4/25	2/25	9/25	5/25
%	7,1	92,8	23	15,3	7,6	34,6	19,2

(75%) soros foram não-reagentes e 7 (25%) foram reagentes, dos quais 4 (57,1%) reagiram até 1:16 e 3 (42%) até 1:64.

Na análise dos pacientes do grupo D foram obtidos 11 (64,7%) pacientes não-reagentes pela IFI-IgG e apenas 6 (35,2%) reagentes, dentre estes 4 (66,6%) indivíduos apresentaram soros com títulos até 1:16 e 2 (33,3%) com títulos de 1:256. Pela técnica de ELISA-IgG foi obtido o

mesmo resultado, sendo que 1 (16,6%) soro reagiu até 1:16, 1 (16,6%) até 1:64, 3 (50%) até 1:256 e 1 (16,6%) até 1:1024. A pesquisa de anticorpos da classe IgM pela IFI não apresentou nenhum resultado positivo, enquanto que pela ELISA apenas 1 (5,8%) soro foi positivo com título de 1:16, apresentando leitura próximo ao *cutoff*.

A análise da correlação entre as técnicas de ELISA-IgG e IFI-IgG através dos títulos obtidos

foi de $r = 0,556$, indicando uma correlação positiva moderada entre as técnicas, embora na análise da correlação entre os soros do grupo "C" tenha apresentado um $r = 0,387$, indicando uma correlação positiva moderada porém mais fraca do que os outros dois grupos ($r = 0,633$ para o grupo "B" e $r = 0,577$ para o grupo A).

A correlação entre as técnicas IFI e ELISA para pesquisa de IgM, apresentou $r = -0,023$, sendo considerada uma correlação negativa fraca.

Os resultados da correlação título\Y dos soros analisados para pesquisa de IgG foi de $r = 0,552$, sendo considerada positiva moderada, não apresentando variação considerável quando analisados em relação aos soros do mesmo grupo ($r = 0,576$ para o grupo A, $r = 0,541$ para o grupo B e $r = 0,374$ para o grupo C).

Em relação a ELISA-IgM, a correlação entre o título e a unidade arbitrária foi de $r = 0,562$, sendo considerada uma correlação positiva moderada.

DISCUSSÃO

Na padronização de técnicas o painel de indivíduos positivos e negativos deve ser escolhido cuidadosamente. Sabe-se que o caráter principal para a escolha do grupo positivo para determinada infecção é o isolamento ou detecção do agente em questão, indicando um processo agudo. Com relação a toxoplasmose, o encontro do parasita torna-se muito difícil, uma vez que a maioria da população já teve contato com o agente apresentando quadros subclínicos e/ou memória sorológica, sendo a clínica apenas sugestiva^{13 26}.

No presente estudo, a partir dos 103 soros utilizados a prevalência da infecção foi de 78,6%, o que concorda com os dados de Nogueira et al²³ que relata que 70% da população no Brasil apresenta anticorpos anti-*T. gondii*, bem como com o trabalho de Coutinho et al¹¹ que encontrou uma prevalência de 78,7% num estudo com 6079 indivíduos do Rio de Janeiro, em um período de sete anos.

Analisando a correlação (r) entre os dois métodos para pesquisa de IgG nos 86 soros dos três grupos estudados (A, B e C), obtivemos uma correlação positiva ($r = 0,556$), concordando com o trabalho de Van Knapen³³. Este autor sugere que o teste de ELISA pode ter boa aplicabilidade no diagnóstico da toxoplasmose em testes de triagem sorológica (identificação de soros positivos e negativos), o que também foi evidenciado em nosso estudo a partir da análise dos valores de copositividade e conegatividade entre as técnicas de IFI e ELISA.

A diferença entre os resultados obtidos pela técnica de ELISA e IFI pode estar relacionada aos diferentes antígenos utilizados, uma vez que na técnica de IFI utilizou-se parasitas íntegros (antígenos de membrana que estimulam a produção de anticorpos mais precocemente na infecção), enquanto que no ELISA utilizou-se

antígenos solúveis (citoplasmáticos), cujos anticorpos seriam formados mais tardiamente na infecção³³. Além disso, o fato de soros não-reagentes pela técnica de ELISA serem reagentes por outros métodos sorológicos clássicos, segundo Van Knapen³³ pode estar relacionado a maior especificidade, menor sensibilidade, diferentes antígenos e a qualidade do conjugado utilizado no teste³³.

Camargo et al⁷ utilizando a técnica de ELISA para IgG e IgM anti-*T. gondii* encontraram boa correlação da ELISA-IgG com o teste de IFI-IgG, enquanto que no presente trabalho esta correlação foi moderada. No entanto, os nossos resultados estão de acordo com os de Camargo et al⁷ no que se refere a ELISA-IgM mostrar-se mais sensível do que a IFI-IgM. Nos estudos de Van Knapen³³, o uso do OPD na revelação das placas gerou densidades ópticas maiores, embora a discriminação entre amostras com maior e menor positividade se tornasse de difícil observação principalmente por leitura visual.

Na realização da técnica de ELISA-IgG qualitativa é necessário considerar as diferenças entre placas e dentro destas devido a diferenças durante os passos de incubação que geram variações na faixa de 10%, o que é importante na obtenção de resultados¹². Devido a este motivo, na padronização do antígeno e no estabelecimento do *cutoff*, os soros controles foram processados em diluições e repetidos em quatro placas distintas, a fim de que fossem minimizadas estas diferenças. O estabelecimento do *cutoff* a partir dos soros negativos diluídos a 1:16, deu-se devido a variações mínimas entre os *cutoff* obtidos nestes mesmos soros em diluições maiores (1:64, 1:256, 1:1024 e 1:4096).

A detecção de IgM específica para a toxoplasmose é muito importante no seu diagnóstico e deve ser realizada e lida com muito

cuidado. Resultados falso positivos podem surgir devido a especificidade do conjugado e presença de fator reumatóide ou antinuclear no soro de pacientes; enquanto que resultados falso negativos podem ser gerados por altas concentrações de IgG no soro. Van Knapen³³ também verificou que pela ELISA foi possível encontrar mais amostras positivas do que com IFI, sugerindo que o ELISA-IgM demonstra anticorpos da classe IgM produzidos não apenas na fase inicial da infecção, bem como para outros antígenos. Apesar destas considerações, no presente experimento, os resultados positivos pela técnica de ELISA-IgM talvez não sejam indicadores de pacientes em fase aguda (falso positivos), uma vez que a IFI (técnica de referência por várias instituições) apresentou resultados negativos e as leituras dos soros pela técnica de ELISA-IgM foram muito próximas ao valor de *cut off* da placa sendo que a maioria destes pacientes não apresentavam clínica sugestiva para toxoplasmose nem confirmação parasitológica. Além disso, analisando a Tabela 2, pode-se verificar que este teste sorológico apresentou um índice de concordância ajustado (K) muito baixo, o que indica pouca confiabilidade da técnica em relação a IFI.

No ELISA-IgM, embora sejam observadas diferenças quanto ao tipo de antígeno utilizado, como já foi proposto em relação a ELISA-IgG, o uso do antígeno solúvel apresentou melhores resultados. Assim como no presente estudo (Tabela 2), Van Knapen³³ encontrou apenas boa conegatividade na avaliação do ELISA-IgM nos soros devido ao número insuficiente de soros IgM-reagentes para toxoplasmose, sendo que a técnica de IFI-IgM nunca alcançou uma copositividade com o ELISA-IgM de mais de 60%. Este fato também foi observado em nosso estudo, onde a copositividade foi de 6,66% (ELISA/IFI) e de 16,66% (IFI/ELISA). Camargo⁶, Camargo et al⁸ e Porstmann e Kiessig²⁵ sugerem que para uma maior especificidade da técnica de ELISA para pesquisa da classe IgM, deve-se proceder a captura dessas imunoglobulinas com anticorpos monoclonais e posterior revelação com antígenos marcados (como por exemplo pela técnica de ISAGA³¹⁶). Mineo et al²¹ propõem o uso da técnica de ELISA reversa para a pesquisa de IgM, a qual, neste trabalho, não apresentou reatividade cruzada com soros de pacientes com outras patologias nem com amostras contendo fator reumatóide IgM.

Johnson et al¹⁷ avaliaram cinco métodos de ELISA para o diagnóstico de toxoplasmose

aguda, utilizando dois testes de ELISA com antígenos recombinantes, os quais apresentaram E e VPP de 100% e VPN de 87,8% e S de 81,3%; e três técnicas comerciais com antígeno derivado de parasita íntegro. As técnicas comerciais mostraram VPP na faixa de 81,6-100% e VPN de 87,8-100% com S de 81,3%-100% e E de 83,7-100%. A técnica de ELISA com antígeno produzido e padronizado neste trabalho apresentou sensibilidade (96,77%) semelhante as técnicas comerciais avaliadas por Johnson et al¹⁷, embora a especificidade (75%) de nosso teste tenha sido menor, enquanto que tanto o VPP (83,33%) quanto o VPN (94,74%) apresentaram-se dentro da faixa apresentada por estes autores.

Segundo Wainstein et al³⁴ o significado da IFI para toxoplasmose (no soro) no diagnóstico da encefalite toxoplásmica permanece alvo de controvérsia, porém o baixo número de soros positivos para detecção de IgM confirma a suposição de que a encefalite toxoplásmica seja uma reativação da forma latente. No presente estudo, nenhum dos 28 pacientes infectados pelo vírus HIV foram soro-reagentes pela IFI-IgM concordando com os achados de Wainstein et al³⁴, onde entre 516 soros avaliados, apenas três foram positivos. Estes mesmo autores relatam que os títulos encontrados em relação a IFI-IgG não apresentam valor diagnóstico, mas devido a alta sensibilidade da técnica (IFI), que foi de 95%, a ausência de anticorpos específicos é interpretada como informação importante para a exclusão da possibilidade de encefalite toxoplásmica, embora a ausência de títulos elevados não afaste a possibilidade da encefalite. A acurácia diagnóstica foi aumentada através de testes seriados permitindo a seleção de pacientes com títulos altos (títulos acima de 1:1000) e da associação dos resultados sorológicos com resultados da tomografia computadorizada gerando uma sensibilidade de 83% e o aumento da especificidade para 56%, enquanto que anteriormente esta especificidade era de 30%. Já em nossos estudos a sensibilidade (83,87%) e especificidade (79,16%) da técnica de IFI foram superiores aos estudos de Wainstein et al³⁴.

Nas Tabelas 2, 3 e 4, estão demonstrados a análise dos soros dos pacientes através das técnicas de ELISA-IgG e IFI-IgG permitindo que pudéssemos conhecer sorologicamente os pacientes estudados. A frequência de títulos altos (títulos iguais ou superiores a 1:1024) foi maior no grupo A (pacientes com clínica sugestiva de toxoplasmose) do que no grupo B (gestantes)

que foi de 5,88%. No grupo de pacientes infectados pelo vírus HIV (grupo C), uma vez que a encefalite toxoplásmica consiste geralmente de um processo de reativação, 82,29% foram soro-reagentes, sendo que 36% apresentavam sorologia alta, embora a presença de títulos sorológicos não seja diagnóstico para a encefalite toxoplásmica, devendo ser associado a outros métodos de diagnóstico³⁴. Associação de títulos altos (iguais ou maiores que 1024) com a detecção do parasita não apresentou diferenças significantes neste trabalho, em nenhum dos grupos estudados.

A partir destes resultados podemos concluir que o teste de ELISA-IgG, padronizado neste trabalho, mostrou-se eficiente para a triagem sorológica de pacientes no diagnóstico da toxoplasmose, apresentando correlação positiva moderada com o teste de IFI-IgG. Já o teste de ELISA-IgM avaliado neste trabalho mostrou-se pouco eficiente para a emissão de resultados positivos na toxoplasmose, e com boa eficiência para emissão de resultados negativos, embora sua concordância baixa com o teste de IFI, sugira pouca confiabilidade nos resultados obtidos como um todo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Mauro C. A Marzochi da ENSP - FIOCRUZ pela revisão do trabalho; às Dras. Elizabete Neves e Maria Clara G. A Galhardo do

Hospital Evandro Chagas – FIOCRUZ e ao Dr. Nilo Vidigal do Instituto Fernandes Figueira – FIOCRUZ pela triagem dos pacientes e colheita do material.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amato Neto V, Campos R, Barazzi RG, Duarte MIS. Toxoplasmose. Editora Savier, São Paulo 1982.
- Angel SO, Matrajt M, Margarit J, Nigro M, Illescas E, Pszeny V, Amendoeira MRR, Guarnera E, Garberi JC. Screening for active toxoplasmosis in patients by DNA hybridization with the ABGTg7 probe in blood samples. *Journal of Clinical Microbiology* 35:591-595, 1997.
- Ashburn D, Joss AWL, Pennington TH, Ho-Yen DO. Specificity and usefulness of an IgE immunosorbent agglutination assay for toxoplasmosis. *Journal of Clinical Pathology* 48:64-69, 1995.
- Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. Bioestatística. 1ª edição rev, Editora Paulista Universitária, São Paulo, 1981.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 27:1787-1792, 1989.
- Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infection and Immunity* 21:55-58, 1978.
- Camargo ME, Ferreira AW, Rocca A, Belem ZR. Um teste prático para a sorologia da toxoplasmose: o teste de hemaglutinação. Estudo comparativo com os testes de imunofluorescência e imunoenzimático de captura de IgM. *Revista Brasileira de Patologia Clínica* 22:196-201, 1986.
- Camargo ME, Leser PG, Leser WSP. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. A comparative study of hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM-immunofluorescence tests in 3752 serum samples. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo* 18:215-226, 1976.
- Camargo ME. Alguns aspectos atuais do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose. *Anais da Academia Nacional Medicina*, 155:236-239, 1995.
- Coutinho SG, Andrade CM, Malvar GS, Ferreira LF. Análise comparativa entre as sensibilidades da reação indireta de anticorpos fluorescentes e da reação de Sabin-Feldman na pesquisa de anticorpos séricos para toxoplasmose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 4:315-325, 1970.
- Coutinho SG, Souza WJS, Camillo-Coura L, Marzochi MCA, Amendoeira MRR. Levantamento dos resultados das reações de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em 6079 pacientes de ambulatório ou gestantes no Rio de Janeiro realizadas durante o exame de 1970-1977. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 23:48-56, 1981.
- Denmark JR, Chessum BS. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and detection of *Toxoplasma* antibody. *Medical Laboratory Science* 35:227-232, 1978.
- Derouin F, Mazon MC, Garin YJF. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology* 25:1597-1600, 1987.
- Guimarães MC, Coutinho SG, Antunes CMF. Normas para a sorologia de moléstias parasitárias. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 20:55-58, 1987.
- Hajeer AH, Balfour AH, Mostratos A, Crosse B. *Toxoplasma gondii*: detection of antibodies in human saliva and serum. *Parasite Immunology* 16:43-50, 1994.
- Jacobs J, Lunde MN. A hemagglutination test for toxoplasmosis. *Journal of Parasitology* 43:308-314, 1957.

17. Johnson AM, Roberts H, Tenter AM. Evaluation of a recombinant antigen ELISA for diagnosis of acute toxoplasmosis and comparison with traditional antigen ELISAs. *Journal of Medical Microbiology* 37:404-409, 1992
18. Laurentino-Silva V. Leishmanioses caninas: padronização e avaliação de métodos imunoenzimáticos para pesquisa de IgG sérica. Tese de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.
19. Levin J. Estatística Aplicada a Ciências Humanas. 2ª edição, Harbra, São Paulo, 1987.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275, 1951.
21. Mineo JR, Camargo ME, Ferreira AW, Almeida G. Pesquisa de anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* por meio de técnica imunoenzimática reversa. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 28:6-11, 1986.
22. Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Clinical Reviews of Academic Science* 147:763-766, 1908.
23. Nogueira AS, Moreira RB, Pereira NG. Toxoplasmose - Diagnóstico e tratamento. *Jornal Brasileiro de Medicina* 71:38-44, 1996.
24. Patel B, Young Y, Duffy K, Tanner RP, Johnson J, Holliman RE. Immunoglobulin-A detection and investigation of clinical toxoplasmosis. *Journal of Medical Microbiology* 38:286-292, 1993.
25. Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *Journal of Immunological Methods* 150:5-21, 1992.
26. Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem das Américas e da África. 2ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991.
27. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108:660-663, 1948.
28. Sánchez RM, Castillo FC, Grana JP. Comparación de ELISA con las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y fijación del complemento para el diagnóstico de la toxoplasmosis. *Revista Cubana Medicina Tropical* 37:269-277, 1985.
29. Sounis E. Bioestatística, 2ª Edição rev, McGraw-Hill do Brasil, Ltda, 1979.
30. Souza WJS, Volpini ICS, Henrique MF, Coutinho SG. Imunofluorescência (IF) para toxoplasmose em frações IgM de soro humano. *Revista Brasileira de Patologia Clínica* 29:47-50, 1993.
31. Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG, Remington JS. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *Journal of Infectious Diseases* 162:270-273, 1990.
32. Toman K. Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de los tests diagnosticos. *Boletín de la Union Internacional contra la Tuberculosis* 56:19-30, 1981.
33. Van Knapen FV. Immunodiagnosis of Toxoplasmosis. *Drukkerij Veenman BV, Wagenigen*, 1984.
34. Wainstein MV, Wolffenbuttel L, Lopes DK, Gonzales HE, Golbspan L, Ferreira L, Sprinz E, Kronfeld M, Edelweiss MI. Sensibilidade e especificidade do diagnóstico clínico, sorológico e tomográfico da encefalite por *Toxoplasma gondii* na síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 26:71-75, 1993.