

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

PATRÍCIA SOARES DA SILVA

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG, IgM E IgA ANTI- *Toxoplasma gondii* EM
AMOSTRAS DE SORO E LEITE DE MULHERES PUÉRPERAS**

UBERLÂNDIA – MG
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

PATRÍCIA SOARES DA SILVA

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG, IgM E IgA ANTI- *Toxoplasma gondii* EM
AMOSTRAS DE SORO E LEITE DE MULHERES PUÉRPERAS**

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte dos
requisitos para o título de Mestre em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

UBERLÂNDIA – MG
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

S586d Silva, Patrícia Soares da, 1977-
Detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de soro e leite de mulheres puérperas / Patrícia Soares da Silva. - Uberlândia, 2005.
50f. : il.
Orientador: José Roberto Mineo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Toxoplasmose - Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU:616.993.1

*Dedico aos meus pais, Robinson
e Helena,
Ao meu irmão Daniel e
Ao meu namorado Heber. Pela
paciência e compreensão
durante a realização deste
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, por ter aceitado me orientar novamente e por toda sua dedicação durante a condução do trabalho.

A Dra. Deise A. O. Silva por sua grande ajuda, atenção e paciência na elaboração deste trabalho.

A Dra. Daniela M. L.M. Ferreira por toda sua contribuição.

A Prof. Dra. Júlia Maria Costa-Cruz por sua colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Imunologia

Aos técnicos do laboratório de Imunologia, em especial ao técnico Antônio Tomas Júnior.

Ao secretário Max, por sempre está disposto a nos ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1-Agente Etiológico.....	1
1.2-Habitat.....	1
1.3-Morfologia.....	2
1.4-Ciclo Biológico.....	3
1.4.1-Ciclo Biológico no hospedeiro definitivo.....	3
1.4.2-Ciclo Biológico no hospedeiro intermediário.....	4
1.5-Transmissão.....	4
1.6-Formas Clínicas.....	5
1.6.1-Toxoplasmose congênita.....	6
1.6.2-Toxoplasmose adquirida.....	6
1.6.3-Toxoplasmose em imunodeficientes.....	7
1.7-Epidemiologia.....	7
1.8-Diagnóstico.....	8
1.8.1-Diagnóstico parasitológico.....	8
1.8.2-Diagnóstico sorológico.....	9
2-OBJETIVOS.....	11
3-JUSTIFICATIVA.....	12
4-MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1-Pacientes e amostras de soro e de leite.....	13
4.2-ELISA indireto.....	14
4.3-Imunofluorescência indireto.....	16
4.4- <i>Western-blot</i>	17
4.5-Análise estatística.....	18
4.6-Normas de Biossegurança.....	18
5-RESULTADOS.....	19
5.1-Detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA pelo ensaio IFI.....	19
5.2-Concordância dos ensaios IFI e ELISA.....	19
5.3-Concordância positiva entre os ensaios IFI, ELISA e <i>Western-blot</i>	22
5.4-Associação de amostras de soro e leite.....	25
5.5-Detecção simultânea de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos no soro e no leite pelos ensaios ELISA, IFI e <i>Western-blot</i>	27
5.6-Detecção de anticorpos específicos pelo ELISA.....	29
5.7-Correlação entre os níveis de anticorpos específicos no soro.....	29
5.8-Correlação entre os níveis de anticorpos específicos no leite.....	32
5.9-Correlação entre os níveis de anticorpos específicos no soro e no leite.....	32
6-DISCUSSÃO.....	35
7-CONCLUSÕES.....	39

8- RESUMO.....	40
9-ABSTRACT.....	41
10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXO I.....	48
ANEXO II.....	49
ANEXO III.....	50

1- INTRODUÇÃO

1.1-Agente etiológico

A toxoplasmose é uma zoonose e a infecção é muito freqüente em várias espécies de aves e mamíferos, inclusive o homem. A infecção tem como agente etiológico o protozoário *Toxoplasma gondii* (NEVES, 2000).

Descoberto independentemente em 1908 por Splendore, em coelhos, no Brasil, e em 1908 por Nicole e Manceaux no gundi, um roedor do norte da África, *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório do reino Protista, subreino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia, subordem Eimerina, família Sarcocystidae e gênero *Toxoplasma* (REY, 2001).

Toxoplasma origina-se do grego “toxon” que significa “arco”, em relação à forma do parasito.

Foram reconhecidas três linhagens de *T.gondii* sendo a de tipo II a mais freqüente como causa de doença e a mais relacionada com a reativação da toxoplasmose na imunodeficiência humana adquirida. A linhagem do tipo I apresenta a mais alta virulência, é menos freqüentemente encontrada em diversos países e a do tipo III ocorre principalmente em animais (REY, 2001).

1.2 - Habitat

Toxoplasma gondii apresenta ampla distribuição geográfica e infecta praticamente todas as células de peixes, aves e mamíferos. Por esse motivo, a toxoplasmose pode ser considerada uma das zoonoses mais freqüentes do mundo, estimando-se que a população

mundial infectada por *T. gondii* corresponda aproximadamente a um bilhão de pessoas (EL ON J; PEISER J, 2003).

Esse parasito sobrevive em líquidos orgânicos como saliva, leite, esperma e em outras secreções e excreções. A especificidade para células e hospedeiro, sugere que *T. gondii* apresente receptores conservados que favorecem o sucesso do seu parasitismo (MCLEOD; MACK; BROWN, 1991).

1.3 - Morfologia

T. gondii apresenta uma morfologia múltipla dependendo do hábitat e do estado evolutivo. A forma taquizoíta (do grego *tachys* = rápido) é encontrada durante a fase aguda da doença e apresenta uma rápida proliferação na célula. Os bradizoítos (do grego *brady* = lento) são formas que se multiplicam lentamente dentro dos cistos, sobrevivem à digestão péptica, são menores que os taquizoítos e com núcleo subterminal e geralmente são encontradas durante a fase crônica da infecção. Os esporozoítos são formas liberadas a partir de esporocistos contidos em oocistos eliminados nas fezes de felídeo e são oriundas da reprodução sexuada do parasito que ocorre no intestino dos felídeos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Semelhante aos outros parasitos do filo Apicomplexa, *T. gondii* apresenta na extremidade anterior ou apical uma forma pontiaguda e na extremidade posterior uma forma arredondada. A extremidade anterior do parasito apresenta aparelho apical composto por conóides, roptrias e também micronemas, que parece ter um importante papel na invasão da célula hospedeira pelo parasito (BOHNE ; HEESEMANN ; GROSS , 1994).

Algumas diferenças entre taquizoítos e bradizoítos, como a velocidade de replicação, o tamanho e a forma do núcleo e o grau de suscetibilidade à digestão péptica, sugerem que existam diferenças antigênicas entre as duas formas do parasito (LUNDE; JACOBS, 1983).

1.4 - Ciclo Biológico

T. gondii possui um ciclo heteroxeno, reproduzindo-se sexuadamente no epitélio intestinal de felídeos (hospedeiro definitivo) e assexuadamente nos demais tecidos de felídeos e outros hospedeiros (intermediários) (REY, 2001).

1.4.1 - Ciclo biológico no hospedeiro definitivo

A reprodução sexuada do *T. gondii* ocorre no epitélio intestinal de felídeos primoinfectados. Nos gatos, cinco tipos morfolologicamente distintos do parasito, desenvolvem-se nas células enteroepiteliais antes de começar a gametogonia. Ocorre replicação do parasito, formando merozoítos por esquizogonia, logo em seguida, formam-se gametócitos (macrogametócitos e microgametócitos). Os macrogametócitos dão origem aos macrogametas (gametas femininos) e os microgametócitos formam microgametas (gametas masculinos) com dois flagelos. Os microgametas fertilizam os macrogametas formando o zigoto que se desenvolve em oocistos, que são eliminados nas fezes. A esporulação do oocisto, formando esporozoítos ocorre de 1 a 5 dias dependendo das condições de temperatura do meio (DUBEY; LINDSAY; SPEER , 1998).

1.4.2 - Ciclo biológico no hospedeiro intermediário

Os hospedeiros intermediários, como peixes, aves e mamíferos, inclusive o homem, ingerem oocistos contendo esporozoítos. Os oocistos sofrem degradação e liberam esporozoítos. Estes invadem as células do hospedeiro e começam a sintetizar proteínas específicas de taquizoítos, que sofrerão endodiogenia, ou seja, um processo de reprodução assexuada semelhante a um brotamento interno que se desenvolverá em dois conóides (SPEER *et al*, 1995).

Em seguida, a célula mãe degenera, deixando os dois toxoplasma-filhos. Em aproximadamente 48 horas, vários taquizoítos poderão invadir novas células, o que caracteriza a fase aguda da infecção. Os cistos caracterizam a fase crônica, uma vez que os parasitos encistados se reproduzem lentamente, protegidos da resposta imune do hospedeiro. Esse mecanismo é devido às paredes do cisto que contêm componentes do parasito e da célula hospedeira (SIMS; TALBOT, 1989).

1.5 - Transmissão

O homem adquire a infecção pelo *T. gondii* por três vias: 1) ingestão de oocisto (esporozoítos) do ambiente; 2) ingestão de cistos teciduais (bradizoítos) encontrados em carne crua ou mal cozida; 3) transmissão de taquizoítos por via transplacentária em gestantes primoinfectadas, por meio transfusões sanguíneas e contato com secreções e excreções (NEVES, 2000).

Os taquizoítos são pouco resistentes às condições do meio, no entanto, os oocistos eliminados pelos felinos embrionam no solo em poucos dias e mantêm-se viáveis por até 12 ou 18 meses no solo úmido e sombreado, o que assegura a contaminação de domicílios e peri-domicílios que podem potencialmente infectar animais domésticos e,

eventualmente, crianças e adultos (REY, 2001). Além disso, outras formas de dispersão dos oocistos, como ventos, chuvas podem representar alto potencial de disseminação. Os insetos, também se comportam como veículo importante (AMENDOEIRA, 1995).

Foram relacionados vários casos de toxoplasmose adquirida em acidentes de laboratório (HERWALDT; JURANEK, 1993).

Uma outra forma de transmissão é a transplacentária. Os taquizoítos atingem primeiro a placenta e, depois, o feto. Nas infecções crônicas não há transmissão transplacentária (REY, 2001).

Outras formas de transmissão são por meio de taquizoítos presentes na saliva, no leite e em outras secreções e excreções. Nesse contexto, a ingestão de leite materno pode ser considerada uma via potencial de infecção, todavia essa hipótese nunca foi claramente demonstrada em humanos (BONAMETTI *et al*, 1997).

1.6 - Formas clínicas

A infecção por *T. gondii* pode ser classificada em fase aguda, fase subaguda e fase crônica. Na fase aguda ocorre multiplicação ativa de taquizoítos no interior de células nucleadas e os sintomas mais comuns são: febre, dor de cabeça e adenopatia. A fase subaguda é caracterizada pela presença de cistos teciduais no fígado, coração, cérebro e globo ocular. Na fase crônica, os parasitos permanecem encistados e viáveis, durante toda a vida, sem afetar a saúde dos hospedeiros imunocompetentes (REY, 2001).

A infecção por *T. gondii* resulta em um amplo espectro apresentações clínicas, que varia desde uma infecção assintomática, a forma mais freqüentemente encontrada, até formas com manifestações graves, com presença de linfadenopatia, coriorretinite, calcificações cerebrais ou até mesmo encefalites fatais. Além disso, a transmissão

transplacentária pode levar a quadros de hidrocefalia, cegueira, surdez e retardamento mental em recém-nascidos (KONG *et al*, 2003).

Segundo Luft e Remington (1992), *T. gondii* é um parasito de baixa virulência, no entanto, ao infectar indivíduos imunocomprometidos ou fetos, torna-se altamente virulento podendo causar morte ou danos irreversíveis.

1.6.1 - Toxoplasmose congênita

Mulheres imunocompetentes com infecção crônica pelo *T. gondii* não contaminam seus filhos, durante o desenvolvimento intra-uterino, no entanto, mulheres que contraem toxoplasmose durante o período de gestação estão sujeitas a riscos de alta gravidade.

O dano ao concepto é mais freqüentemente observado quando a infecção materna ocorre entre a concepção, ou por um curto período antes desta, e o sexto mês de gravidez, caracterizando um quadro agudo ou subagudo. Por outro lado, quando a infecção materna ocorre no último trimestre de gestação, a doença congênita tende a ser mais branda ou assintomática.

A toxoplasmose pode se manifestar logo após o nascimento, alguns dias ou até anos depois. Retinocoroidite, calcificações cerebrais, perturbações neurológicas e hidrocefalia ou microcefalia são as síndromes mais características (REY, 2001).

1.6.2 - Toxoplasmose adquirida

Toxoplasmose adquirida na infância ou na idade adulta é mais comumente assintomática, não exibindo um quadro clínico típico, sendo por isto inicialmente caracterizada como fazendo parte da síndrome da mononucleose infecciosa. Adenopatias e

retinocoroidite, quando presentes, são os sintomas mais freqüentes. A retinocoroidite cuja etiologia é confirmada em decorrência da infecção pelo *T. gondii*, pode levar a alterações da visão e até sua perda total (TABBARA, 1995).

1.6.3 - Toxoplasmose em imunodeficientes

A doença é extremamente grave em pacientes imunodeprimidos. Na maioria dos casos desenvolve-se um quadro clínico de encefalite aguda que pode levar o paciente ao óbito em poucos dias, caso não seja convenientemente tratado (REY, 2001).

As alterações mais comuns são encefalites, confusão mental, febre e sintomas neurológicos focais.

Pacientes imunodeprimidos com toxoplasmose podem também apresentar coriorretinite, pneumonite ou envolvimento de múltiplos órgãos, apresentando falhas respiratórias agudas e anormalidades semelhantes ao choque séptico. Pneumonites por *T. gondii* têm sido mais freqüente em pacientes submetidos a transplantes de órgãos, aos receptores de medula óssea e em pacientes com AIDS.

1.7 - Epidemiologia

É estimado que um bilhão de pessoas esteja infectado no mundo todo e muitos estudos apontam que a soroprevalência em humanos varia consideravelmente entre diferentes países, entre áreas geográficas distintas dentro de um mesmo país, e entre diferentes grupos étnicos na mesma área (BONAMETTI *et al*, 1997).

De acordo com Rey (2001), a distribuição da toxoplasmose é universal, tendo sido registrada em todos os continentes e em todos os climas. No Brasil, os índices situam-se entre 50 e 80% (FERREIRA; ÁVILA, 1996).

A importância dos animais domésticos como fonte de infecção foi verificada também no estado de Minas Gerais. O contato com gatos, galinhas e porcos mostrou uma correlação estatisticamente significativa, porém o mesmo não foi encontrado quando se analisou o consumo de carne, leite e ovos (DE CAMARGO; ANTUNES; CHIARI, 1994).

Alguns estudos indicam que a positividade aumenta com a idade do indivíduo: 0% abaixo dos cinco anos, 18% de 6 a 15 anos e 26% de 16 a 30 anos, sendo mais elevadas nas zonas rurais (REY, 2001).

A soroprevalência de toxoplasmose em mulheres e crianças varia entre 4 e 100%. A incidência da infecção materno-fetal durante a gravidez varia de 1 a 310 para 10.000 grávidas na população da Europa, da Ásia e da América (BONAMETTI *et al*, 1997).

No Brasil, a soroprevalência em parturientes com toxoplasmose varia entre 50 e 76%, já a ocorrência de toxoplasmose congênita varia entre 0,2 a 2% (SILVEIRA *et al*. 1988, REICHE *et al*. 2000, NETO *et al*. 2000). Em Uberlândia - MG, a soroprevalência em parturientes é de 51,65% e a ocorrência de toxoplasmose congênita é de 0,5% (SEGUNDO *et al*, 2004).

1.8 – Diagnóstico

1.8.1 - Diagnóstico parasitológico

Demonstrar a presença de toxoplasma no organismo do paciente, ou isolar os parasitos mediante a inoculação do material suspeito em animais de laboratório ou cultura de células, constitui as principais técnicas parasitológicas de diagnóstico, mas devido às

limitações da utilização dessas técnicas, associadas a sua relativa baixa sensibilidade, os métodos sorológicos são os mais comumente utilizados para o diagnóstico da toxoplasmose (REY, 2001).

A detecção do parasito por isolamento ou a demonstração de seus componentes, a partir de tecidos ou de fluidos orgânicos de pacientes, como antígenos secretórios ou segmentos de DNA, é de alto valor diagnóstico. Embora esta modalidade venha assumindo posição de destaque, especialmente quando utilizada em pacientes imunodeficientes, ela apresenta a desvantagem de não permitir a definição do estágio da doença (FERREIRA; ÁVILA, 1996).

Até o momento, a identificação do parasito geralmente é possível somente em pacientes sintomáticos, sendo que a obtenção de material biológico mediante a realização de biópsia apresenta dificuldades e riscos significantes.

1.8.2 - Diagnóstico sorológico

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose tem se baseado em geral na pesquisa de anticorpos contra o parasito, empregando-se desde técnicas sorológicas mais clássicas, com a reação de Sabin-Feldman, até reações mais contemporâneas, como a detecção de diferentes isotipos dirigidos contra epitopos imunodominantes presentes nas diversas formas evolutivas do parasito. No entanto, a correta interpretação dos resultados advindos do emprego dos métodos sorológicos aplicados à toxoplasmose apresenta-se atualmente como um desafio tanto para os pesquisadores envolvidos com pesquisa clínica como experimental. Uma das mais complexas implicações diz respeito à tomada de decisão que, baseando-se nos resultados dos testes sorológicos, possa se determinar com exatidão o momento em que infecção ocorreu.

Os testes imunoenzimáticos são os mais amplamente utilizados nas rotinas laboratoriais para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, entre eles, os testes ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e o teste de imunofluorescência. O *Western-blot* tem sido muito importante na pesquisa de antígenos e de anticorpos para auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose (FERREIRA; ÁVILA, 1996).

Uma outra estratégia que tem sido frequentemente empregada por diferentes investigadores refere-se à utilização de combinações de testes sorológicos que permitam uma determinação dos estágios da infecção por *T. gondii* (MONTROYA; LIESENFELD 2004).

2- OBJETIVOS

Detectar a presença e comparar a frequência de detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em amostras de leite e soro de mulheres puérperas, utilizando os testes imunoenzimáticos ELISA indireto, imunofluorescência indireta e *Western-blot*.

3- JUSTIFICATIVA

Embora seja freqüentemente relatado que o leite possa ser um veículo de transmissão potencial de *T. gondii* e que este tipo de transmissão possa ocorrer quando a mãe é infectada durante as últimas semanas de gestação ou durante a amamentação, não existem estudos que identifiquem a presença de diferentes classes de anticorpos no leite de mulheres infectadas por este parasito. A detecção destes anticorpos no leite é de fundamental importância para se avaliar o grau de proteção passiva que possa ser conferido por este veículo. Segundo Azab *et al* (1992), baixos níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de soros podem ser secretado no leite e proteger o lactente.

Já foi descrita na literatura a utilização do teste de imunofluorescência para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro e leite de mulheres lactantes. O teste ELISA foi até o momento somente empregado em modelos experimentais, utilizando-se amostras de leite de camundongos, como descrito por Chardès *et al* (1990). Não há relatos da realização deste tipo de imunoensaio em amostras de leite humano. Considerando-se esse fato e a elevada sensibilidade, especificidade e rapidez do teste ELISA, é fundamental a padronização desse imunoensaio para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de leite materno humano.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Pacientes e amostras de soro e de leite

No período de 2003 a 2005 amostras de soro e de leite foram obtidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), no setor de Ginecologia e Obstetrícia, sendo todas de mulheres puérperas, clinicamente saudáveis. Nenhuma delas apresentava febre ou evidências de mastite e seus recém-nascidos eram de termo, saudáveis e se encontravam internados em sistema de alojamento conjunto.

Essas amostras foram obtidas simultaneamente entre 15 e 30 dias após o parto. As amostras de leite foram coletadas por ordenha manual, pela manhã, no intervalo entre duas mamadas. Essas amostras foram utilizadas pelos projetos de N° CEP 137/03 e de N° CEP 194/04. Ambos os processos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

As amostras de sangue e de leite foram centrifugadas a 500 g por 10 minutos a 4°C (Sorvall RC 5C Plus, EUA). Alíquotas das amostras de soro foram imediatamente estocadas a -20°C até o momento dos ensaios. Após centrifugação, a porção gordurosa foi retirada da superfície utilizando-se pipetas e imediatamente desprezada, sendo que as alíquotas também foram estocadas a -20°C até a realização dos testes.

Das amostras coletadas foi possível a análise 98 amostras de soro, por meio dos ensaios de imunofluorescência indireta e ELISA, para a detecção de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*.

Das amostras de leite coletadas foi possível serem analisadas em paralelo com 89 amostras de soro pelos ensaios IFI e ELISA para a detecção de IgG, ao passo que para a detecção de IgM e IgA foi possível parrear 87 amostras de soros e de leite. Isso foi devido ao volume insuficiente de algumas amostras, pois estas foram também utilizadas para a padronização dos testes.

Para a realização dos testes IFI e ELISA nas amostras de soros, foram utilizadas amostras independentes de soros sabidamente reativas para *T. gondii*. No início dos ensaios, não se dispunham de amostras de leite reativas para os testes IFI e ELISA, as quais foram obtidas durante a realização destes testes. Após realização dos testes por titulação em bloco do antígeno, conjugado e diluição das amostras, determinaram-se as condições ótimas dos ensaios e a seleção das amostras de referência reativas de leite que apresentaram maior reatividade no IFI e no ELISA. Como amostras de referência não reativas, foram selecionadas três amostras de leite que não apresentaram reatividades nos dois ensaios. Estas amostras de referências selecionadas foram submetidas também ao teste *Western-blot*, sendo confirmada a reatividade e a não reatividade determinada pelo IFI e ELISA.

4.2 - ELISA indireto

O ensaio ELISA indireto no soro foi realizado conforme descrito por Mineo; Camargo; Ferreira (1980).

Para a padronização do teste ELISA no leite, diferentes diluições das amostras, dos conjugados e diferentes tempos de incubação, foram previamente avaliados.

Microplacas ELISA (poliestireno ou polivinilcloreto) foram sensibilizadas com 50 µL de antígeno solúvel de *T. gondii* (extrato sonificado) da cepa RH na concentração de 10 µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6. Em seguida as placas foram incubadas a 4°C por 18 horas.

Após esse período as placas foram lavadas por três vezes com PBS contendo Tween 20 (PBS/T) a 0,05% e a seguir adicionou-se 50 µL de soro nas diluições 1:64 (para detecção de IgG e IgM) e 1:16 (para detecção de IgA) em PBS/T acrescido de 5% de leite

desnatado (Molico, Nestlé). Para as amostras de leite, as placas foram bloqueadas com PBS/T a 0,05% e adicionou-se 50 µL das amostras na diluição 1:5 (IgG, IgM e IgA).

As placas foram incubadas a 37°C durante 1 hora para as amostras de leite ou soro, sendo a seguir novamente lavadas como anteriormente descrito para posterior adição de 50 µL do conjugado (anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM humanas marcadas com peroxidase) (Sigma, St. Louis, EUA). As diluições ótimas foram determinadas em 1:2000 para IgG e IgM e 1:500 para IgA para as amostras de soros. Diluições ótimas de 1:1000 para IgG, 1:2000 para IgM e 1:500 para IgA foram determinadas para as amostras de leite.

As placas foram novamente incubadas por 1 hora a 37°C, sendo a seguir lavadas como anteriormente descrito e volumes de 50 µL do substrato enzimático foram adicionados às placas. O substrato foi preparado misturando-se 10 µL de H₂O₂ a 30% com 5 mg de OPD (ortofenilenodiamina), diluídos em 5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 5,0). Após 10 a 15 minutos à temperatura ambiente em câmara escura, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com filtro de 492nm.

O valor do *cut off* foi definido pela média aritmética acrescida de três desvios padrão (DP), das densidades ópticas com três amostras de referência não-reativas.

Os valores foram expressos como Índice ELISA (IE) que foi calculado pela aplicação da seguinte fórmula:

$$IE = (\text{absorbância da amostra testada} / \text{cut off}).$$

As amostras cujos Índices ELISA resultaram em valores maiores ou iguais que 1,3 foram consideradas reativas.

4.3 - Imunofluorescência Indireta

O teste de Imunofluorescência indireta nas amostras de soros foi realizado conforme descrita por Figueiredo e colaboradores (2001).

Para padronização do teste de imunofluorescência indireta nas amostras de leite, diferentes diluições das amostras de leite, dos conjugados e diferentes tempos de incubação foram previamente avaliados.

Às lâminas contendo antígenos fixados (taquizoítas formolizados de *T. gondii*) foram adicionados volumes de 10 µL das amostras de soro e de leite, incluindo-se as amostras reativas e não-reativas, diluídas em PBS. As diluições ótimas determinadas para as amostras a serem testadas foram de 1:16 para IgG e IgM e 1:8 IgA nas amostras de soro e 1:2 para IgG, IgM e IgA nas amostras de leite.

Após 30 minutos de incubação para amostras de soro e 45 minutos de incubação para as amostras de leite a 37°C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas três vezes, por 5 minutos em PBS. Depois da secagem em temperatura ambiente, adicionou-se igual volume dos conjugados, constituídos de anticorpos anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM humanas marcados com isotiocianato de fluoresceína, diluídos em PBS e azul de Evans. Foram determinadas as diluições ótimas de 1:80 para IgG, 1:40 para IgM e 1:20 para IgA para as amostras de soro e as diluições de 1:30 para IgG e IgM e 1:10 para IgA para as amostras de leite. Decorridos 30 minutos de incubação para as amostras de soros e 45 minutos de incubação para as amostras de leite a 37°C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas como anteriormente descrito e montadas em glicerina alcalina pH 8,5. As reações foram avaliadas em microscópio de imunofluorescência (Olympus, Tokyo, Japão). Foram considerados resultados positivos somente amostras que apresentaram fluorescência em torno de toda a membrana plasmática externa do *T. gondii*.

4.4 - Western-blot

Antígenos solúveis de *T. gondii* foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970), sendo as frações obtidas transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose, conforme método descrito por Towbin; Staehelin; Gordon (1979).

O teste de *Western-blot* foi realizado em todas as amostras de soro e de leite que apresentaram resultados discordantes nos testes IFI e ELISA. Tiras de nitrocelulose contendo o antígeno de *T. gondii* foram bloqueadas com 1000 µL de PBS/T a 0,05% acrescidas de 5% de leite desnatado por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação lenta. Amostras de soros foram a seguir adicionadas na diluição 1:50 em PBS/T a 0,05%, acrescidos de 1% de leite desnatado. As amostras de leite foram testadas na diluição de 1:5 em PBS/T a 0,05%. Após período de incubação de 18 horas a 4°C, as membranas foram lavadas em PBS/T a 0,05% por seis vezes durante 5 minutos cada lavagem. Após a realização deste procedimento, as membranas foram incubadas com conjugado (anticorpos anti-IgG ou anti-IgA ou anti-IgM humanas marcados com peroxidase) (Sigma, St. Louis, EUA) nas diluições ótimas de 1:2000 para IgG, 1:1500 para IgM e 1:500 para IgA para as amostras de soro e de leite. Incubou-se por 2 hs à temperatura ambiente e procedeu-se a nova série de lavagens como anteriormente descrito, sendo a reação foi revelada com o produto FAST-DAB (Sigma, St Louis, EUA), dissolvendo-se uma pastilha de 3,3' diaminobenzidina e uma pastilha de H₂O₂ em 5 mL de água destilada.

O critério de reatividade tanto para as amostras de soros como para as amostras de leite foram estabelecidas baseando-se na detecção de anticorpos dirigidos contra o antígeno imunodominante TgSAG-1 (p30) presente na superfície de formas taquizoítas de *T. gondii*.

4.5 - Análise estatística

O aplicativo Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA) foi utilizado para a análise dos dados e para a apresentação dos resultados obtidos na forma de gráficos.

Comparações entre os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* determinados pelo ELISA foram analisados segundo o teste *t* de Student.

Correlações entre as diferentes classes de anticorpos (IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*) foram analisadas pelo teste de correlação de Pearson e curvas de regressão linear.

As porcentagens de reatividades dos anticorpos pertencentes às diferentes classes foram comparadas por meio do teste qui-quadrado e do teste exato de Fisher.

As diferenças foram consideradas significativas para os valores de $p \leq 0,05$.

4.6 – Normas de Biossegurança

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de material biológico e utilização de equipamentos seguiram as normas de biossegurança descritas por Chaves-Borges e Mineo (1997).

5- RESULTADOS

5.1 - Detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA pelo ensaio de IFI

A presença de IgG específica anti-*T. gondii* foi detectada em 59 (60,2%) amostras de soro e em 8 (9,0%) amostras de leite, de um total de 98 amostras de soro e 89 amostras de leite analisadas (Tabela 1). Houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos nos dois grupos analisados por este ensaio ($p < 0,0001$).

Detectou-se IgM específica em 2 amostras de soro (2,0%) e em 2 amostras de leite (2,3%), de um total de 98 amostras de soro e 87 amostras de leite (Tabela 1), não havendo diferença significativa na comparação entre estes resultados ($p > 0,05$).

Presença de IgA específica foi evidenciada em 24 (24,5%) amostras de soro de um total de 98 e 22 (25,3%) amostras de leite de um total de 87 (Tabela 1), também não havendo diferença estatisticamente significativa na comparação entre estes valores ($p > 0,05$).

5.2 - Concordância dos ensaios IFI e ELISA

Das 98 amostras de soro analisadas, os resultados foram concordantes em 84 (85,7%) amostras na detecção de IgG anti-*T.gondii*, 85 (86,7%) na detecção de IgM e 73 (74,4%) na detecção de IgA. Foram discordantes em 14 (14,3%) amostras de soro para IgG específica, em 13 (13,2%) na detecção de IgM e em 25 (25,5%) na detecção de IgA (Tabela 2).

Considerando-se um total de 89 amostras de leite analisadas para a detecção de IgG, foram concordantes 52 (58,4%) amostras e discordantes 37 (41,6%) (Tabela 2).

Tabela 1. Detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, pelo ensaio de imunofluorescência indireta (IFI), em amostras de soro e leite provenientes de puérperas do município de Uberlândia – MG, no período 2003-2005.

Classes de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	Amostras de soro n (%)	Amostras de leite n (%)
IgG	59 (60,2)	8 (9,0)
IgM	2 (2,0)	2 (2,3)
IgA	24 (24,5)	22 (25,3)

Tabela 2. Resultados comparativos obtidos nos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFI) para a detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, em amostras de soro e leite provenientes de puérperas do município de Uberlândia – MG, no período 2003-2005.

Classes de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	ELISA/ IFI		ELISA/ IFI	
	Concordantes n (%)		Discordantes n (%)	
	+/+	-/-	+/-	+/-
Soro				
IgG	54 (55,1)	30 (30,6)	9 (9,2)	5 (5,1)
IgM	0 (0)	85 (86,7)	11 (11,2)	2 (2,0)
IgA	7 (7,1)	66 (67,3)	8 (8,2)	17 (17,3)
Leite				
IgG	8 (9,0)	44 (49,4)	37 (41,6)	0 (0)
IgM	2 (2,3)	59 (67,8)	26 (29,9)	0 (0)
IgA	19 (21,8)	36 (41,4)	29 (33,3)	3 (3,4)

Da análise das 87 amostras de leite utilizadas na detecção de IgM e de IgA, foram concordantes 61 (70,1%) amostras para IgM e 55 (63,2%) para IgA. Foram discordantes 26 (29,9%) amostras de leite para a detecção de IgM e 32 (36,7%) para a detecção de IgA (Tabela 2).

5.3 - Concordância positiva entre os ensaios IFI, ELISA e *Western-blot*

O ensaio *Western-blot* foi utilizado como um teste confirmatório quando foram encontrados resultados discordantes entre o ELISA e o IFI. A Figura 1 mostra um WB representativo realizado com amostras de soros (Figura 1A) e amostras de leite (Figura 1B), identificando-se a reatividade para os antígenos imunodominantes de *T. gondii*.

Das 98 amostras de soros analisadas, 56,1% foram concordantes positivas para a detecção de IgG anti-*T. gondii*, sendo 54 amostras concordantes positivas para os ensaios IFI e ELISA. Dentre as 14 amostras discordantes, apenas uma foi confirmada positiva pelo *Western-blot* (Figura 1A).

Não houve nenhuma concordância positiva para a detecção de IgM, sendo que das 13 amostras discordantes nenhuma foi confirmada positiva pelo *Western-blot* (Figura 1A). Observou-se uma concordância positiva de 20,4% para a detecção de IgA, sendo 7 amostras concordantes positivas para IFI e ELISA e 13 confirmadas positivas pelo *Western-blot* (Tabela 3). A reatividade para IgG anti-*T. gondii* foi o evento mais frequente dentre as amostras de soros ($p < 0,0001$).

Em relação às amostras de leite, das 89 amostras analisadas para a detecção de IgG específica, 8 foram concordantes positivas para IFI e ELISA, e das 37 discordantes, 33 confirmadas positivas pelo *Western-blot* (Figura 1B), resultando numa concordância relativa de 46,1% (Tabela 3).

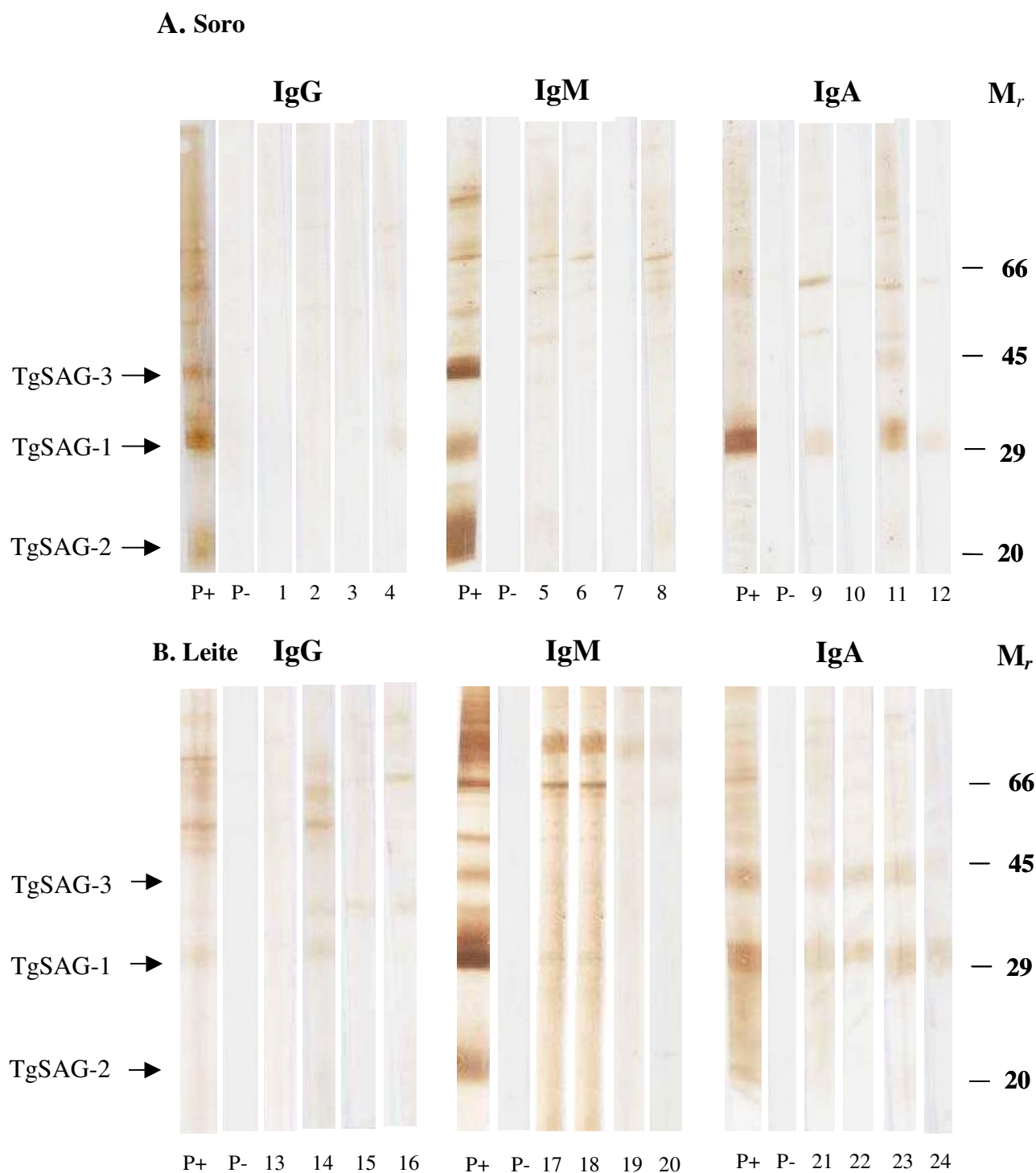


Figura 1. Western-blot realizado com antígeno solúvel de *T. gondii* para a detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA representativo de um conjunto de amostras de soro (A) e leite (B) provenientes de puérperas do município de Uberlândia – MG, no período 2003-2005. Reatividade para os principais antígenos imunodominantes do parasito e os respectivos pesos moleculares de referência em kDa estão representados. Amostras discordantes representadas de 1 a 24, p+ e p- representam respectivamente padrões positivos e negativos.

Tabela 3. Frequência absoluta (n) e relativa (%) da reatividade de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em amostras de soro e leite provenientes de puérperas do município de Uberlândia – MG, no período 2003-2005, obtidas nos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) , imunofluorescência indireta (IFI) e *Western-blot* (WB).

	Classes de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	Número de amostras	Resultados concordantes ^a n (%)	Resultados discordantes ^b n (%)	WB ^c n (%)	Total ^d n (%)
Soro						
	IgG	98	54 (55,1)	14 (14,3)	1 (1,0)	55 (56,1)
	IgM	98	0 (0)	13 (13,3)	0 (0)	0 (0)
	IgA	98	7 (7,1)	25 (25,5)	13 (13,3)	20 (20,4)
Leite						
	IgG	89	8 (9,0)	37 (41,6)	33 (37,1)	41 (46,1)
	IgM	87	2 (2,3)	26 (29,9)	4 (4,6)	6 (6,9)
	IgA	87	19 (21,8)	32 (36,8)	22 (25,3)	41 (47,1)

^a Resultados concordantes obtidos por ELISA e IFI;

^b Resultados discordantes obtidos por ELISA e IFI;

^c Resultados positivos obtidos por WB dentre as amostras com resultados discordantes em ELISA/IFI;

^d Número total de amostras reativas, que inclui o número de amostras que apresentaram resultados concordantes pelo ELISA e IFI, acrescido do número de amostras com resultados positivos no WB.

Das 87 amostras de leite analisadas para a detecção de IgM e IgA, 2 foram concordantes positivas para IgM nos testes IFI e ELISA, e das 26 discordantes, 4 foram confirmadas positivas pelo *Western-blot* (Figura 1B) com uma concordância relativa de 6,9% (Tabela 3).

Houve uma concordância positiva de 47,1% para a detecção de IgA, sendo que 19 foram concordantes positiva para IFI e ELISA, e das 32 discordantes, 22 foram confirmadas positivas pelo *Western-blot* (Tabela 3).

Assim, não houve diferença estatisticamente significativa quando se comparou as frequências de reatividades para IgG e IgA ($p > 0,05$) nas amostras de leite, mas ambos isotipos foram significativamente mais frequente do que o isotipo IgM ($p < 0,05$).

5.4-Associação de amostras de soro e leite

Das amostras de soro e leite, parearam-se 89 amostras para a detecção de IgG e 87 para a detecção de IgM e IgA. Desse total obteve-se a associação de 79 (88,7%) amostras para a detecção de IgG anti-*T. gondii*, 81 (93,1%) para IgM e 52 (59,7%) para a detecção de IgA (Tabela 4).

Não houve associação em 10 (11,2%) amostras para a detecção de IgG específica, em contraposição a 6 (6,9%) para IgM e em 35 (40,2%) amostras para a detecção de IgA (Tabela 4).

Foi demonstrado que não houve diferença estatisticamente significativa na detecção de IgG específica ao *T. gondii* quando se comparou os resultados obtidos entre as amostras de soro e leite ($p > 0,05$), enquanto os isotipos IgA e IgM mostraram taxas maiores de ocorrência no leite do que no soro ($p < 0,0001$).

Tabela 4. Frequência absoluta (n) e relativa (%) obtidas na detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* associando-se amostras de soro e leite, provenientes de puérperas do município de Uberlândia – MG, no período 2003-2005, a partir dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI) e *Western-blot* (WB).

Classes de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	SORO/ LEITE		SORO/ LEITE	
	Associação n (%)		Não Associação n (%)	
	+/+	-/-	+/-	-/+
IgG	40 (44,9)	39 (43,8)	9 (10,1)	1 (1,1)
IgM	0 (0)	81 (93,1)	0 (0)	6 (6,9)
IgA	11 (12,6)	41 (47,1)	5 (5,7)	30 (34,5)

5.5-Detecção simultânea de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos no soro e no leite pelos ensaios ELISA, IFI e Western-blot

Das 96 amostras de soros analisadas pelos ensaios ELISA, IFI e confirmadas pelo *Western-blot*, nenhuma amostra foi simultaneamente positiva para os anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* e 40 (41,7%) foram simultaneamente negativas para as três classes de anticorpos específicos (Tabela 5).

Foram simultaneamente positivas para IgG e IgA 16 (16,6%) amostras de soro e simultaneamente negativas para IgM e IgA 36 (37,5%) amostras. Apenas 4 (4,2%) amostras de soros foram positivas somente para IgA. Nenhuma amostra foi positiva somente para IgM e nem simultaneamente positiva para IgG e IgM, e IgM e IgA (Tabela 5).

Considerando-se 85 amostras de leite analisadas, somente 2 (2,3%) foram simultaneamente positivas para IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, e 28 (32,9%) foram simultaneamente negativas para as três classes de anticorpos específicos (Tabela 5).

Somente 4 (4,7%) amostras de leite foram simultaneamente positivas para IgM e IgA, 22 (25,9%) positivas para IgG e IgA, 16 (18,9%) positivas apenas para IgG e 13 (15,3%) simultaneamente negativas para IgG e IgM. Nenhuma amostra foi positiva somente para IgM e nem simultaneamente positiva para IgG e IgM (Tabela 5).

Comparações entre os resultados observados nas amostras de soro e leite demonstraram que a reatividade de IgG ao *T. gondii* foi mais freqüente nas amostras de soros ($p < 0,0001$), enquanto que a reatividade de IgA foi mais freqüente nas amostras de leite ($p < 0,0001$). Todavia, quando ambos isotipos estavam presentes, não houve diferença significativa quando foram comparadas as amostras de soro e leite ($p > 0,05$).

Tabela 5. Frequência absoluta (n) e relativa (%) obtidas na detecção simultânea ou não dos anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em amostras de soro e leite, provenientes de puérperas do município de Uberlândia – MG, no período 2003-2005, a partir dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI) e *Western-blot* (WB) .

IgG/IgM/IgA	Amostras de soro n (%)	Amostras de leite n (%)
+/+/+	0 (0)	2 (2,3)
+/+/-	0 (0)	0 (0)
+/-/+	16 (16,6)	22 (25,9)
-+/+	0 (0)	4 (4,7)
+/-/-	36 (37,5)	16 (18,9)
-+/-	0 (0)	0 (0)
-/-/+	4 (4,2)	13 (15,3)
-/-/-	40 (41,7)	28 (32,9)
Total	96 (100)	85 (100)

5.6-Detecção de anticorpos específicos pelo ELISA

As médias das concentrações de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* nas amostras de soros expressas em índice ELISA (I.E) foram respectivamente de 5,96 (IC 95%: 4,82-7,10), de 0,79 (IC 95%: 0,71-0,86) e de 0,85 (IC 95%: 0,74-0,96) (Figura 2A). Níveis de anticorpos IgG foram significativamente mais altos do que os encontrados para IgM ou IgA ($p < 0,0001$).

Nas amostras de leite as médias das concentrações de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* expressas em índice ELISA (I.E) foram respectivamente de 2,50 (IC 95%: 1,88-3,12), de 1,22 (IC 95%: 1,00-1,45) e de 1,86 (IC 95%: 1,54-2,19) (Figura 2B). Não houve significância estatística entre os níveis de IgG e IgA ($p > 0,05$), embora os níveis de ambos isotipos fossem significativamente maiores que os níveis de IgM ($p < 0,002$ e $p < 0,001$, respectivamente).

5.7-Correlação entre os níveis de anticorpos específicos no soro

Os dados de correlação entre os níveis de anticorpos específicos nas amostras de soros estão demonstrados na Figura 3. Todas as correlações obtidas entre os níveis de anticorpos detectados nas amostras de soros analisadas foram positivas.

A Figura 3A mostra os índices de correlações positivas entre os níveis de IgG e IgM ($r = 0,40$) ($p < 0,0001$). Também foi positivo o índice de correlação obtido entre os níveis de IgG e IgA ($r = 0,53$) ($p < 0,0001$) (Figura 3B). Como demonstrado na Figura 3C, observou-se uma correlação positiva entre os níveis de IgA e IgM ($r = 0,49$) ($p < 0,0001$).

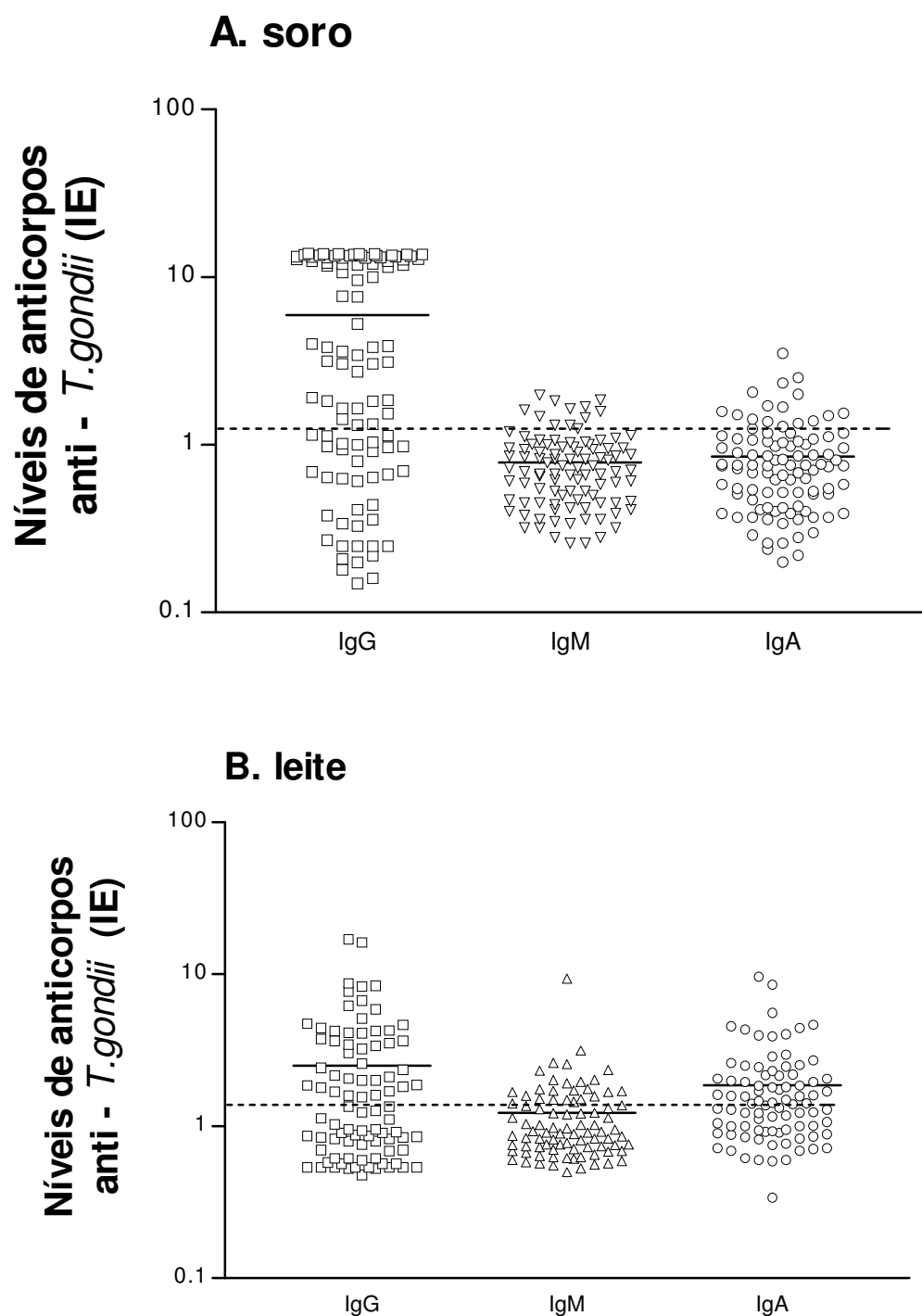


Figura 2. Níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, mensurados em índices ELISA (IE), em amostras de soro (**A**) e leite (**B**) provenientes de puérperas do município de Uberlândia – MG, no período 2003-2005.

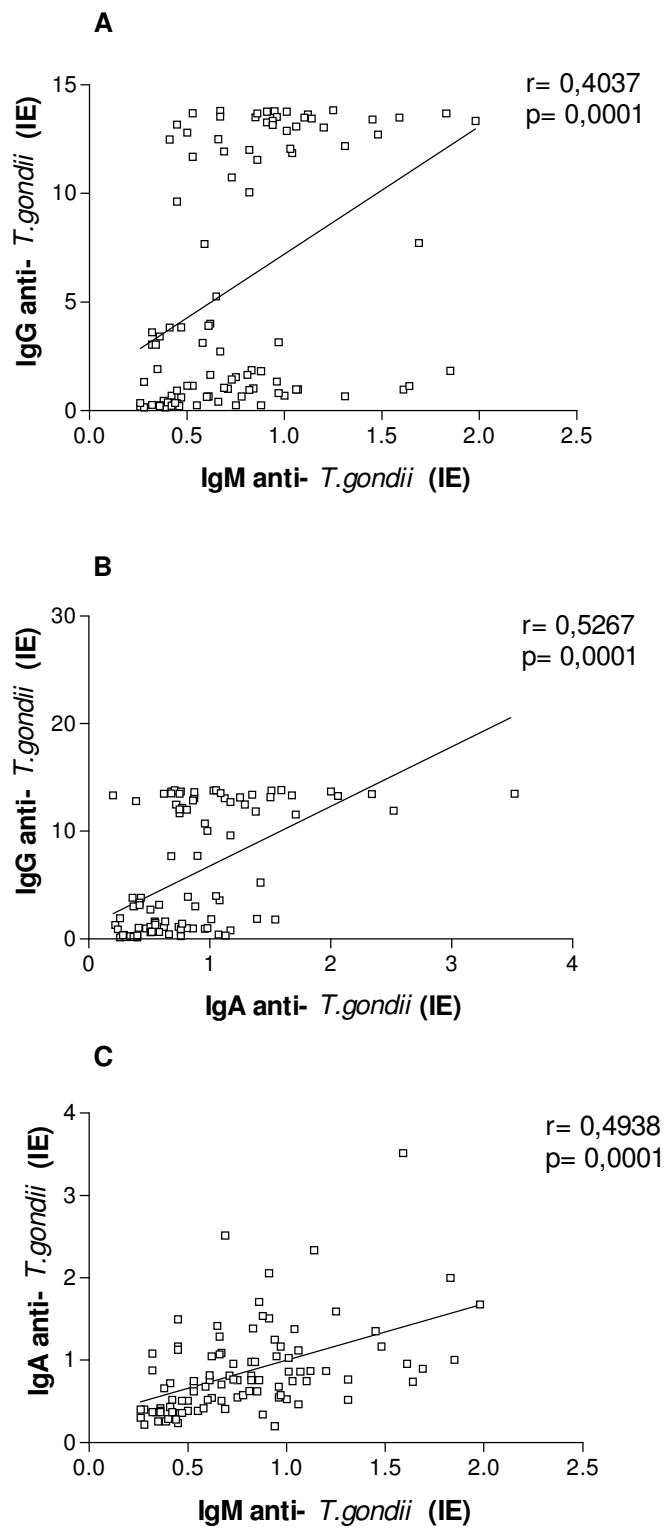


Figura 3. Correlação entre as classes de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, em amostras de soros provenientes de puérperas do município de Uberlândia – MG, no período 2003-2005. (A) IgG vs IgM; (B) IgG vs IgA; (C) IgA vs IgM.

5.8-Correlação entre os níveis de anticorpos específicos no leite

Os dados de correlação entre os níveis de anticorpos encontrados para as amostras de leite estão demonstrados na Figura 4. Não foram observadas correlações positivas entre os níveis de IgG e IgM ($r = 0,72$) ($p > 0,05$) e de IgG e IgA ($r = 0,73$) ($p > 0,05$) (Figuras 4A e 4B, respectivamente). Por outro lado, como demonstrado na Figura 4C, houve uma correlação positiva somente entre os níveis de IgA e IgM ($r = 0,45$) ($p < 0,0001$).

5.9-Correlação entre os níveis de anticorpos específicos no soro e no leite

Os dados de correlação entre os níveis de anticorpos encontrados nas amostras de soros e de leite estão demonstrados na Figura 5.

Houve correlação positiva somente entre os níveis de IgG específica anti-*T. gondii* nas amostras de soro e leite ($r = 0,53$) ($p < 0,0001$) (Figura 5A).

Não foi observada correlação positiva entre os níveis de IgM específica ($r = 0,10$) ($p > 0,05$) (Figura 5B), assim como também não se observou correlação positiva entre os níveis de IgA específica ($r = 0,01$) ($p > 0,05$) (Figura 5C).

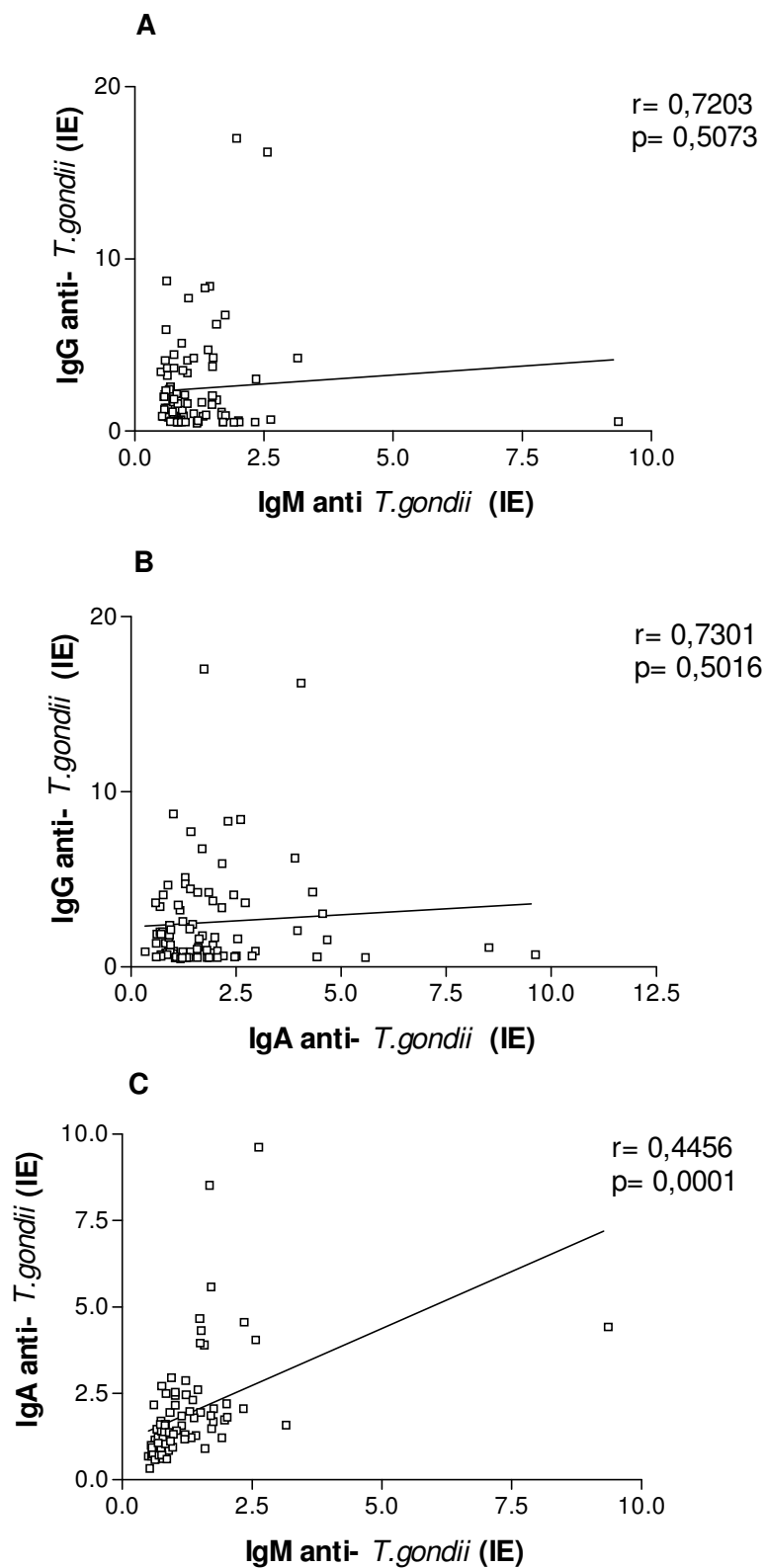


Figura 4. Correlação entre as classes de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, em amostras de leite provenientes de puérperas do município de Uberlândia – MG, no período 2003-2005. (A) IgG vs IgM; (B) IgG vs IgA; (C) IgA vs IgM.

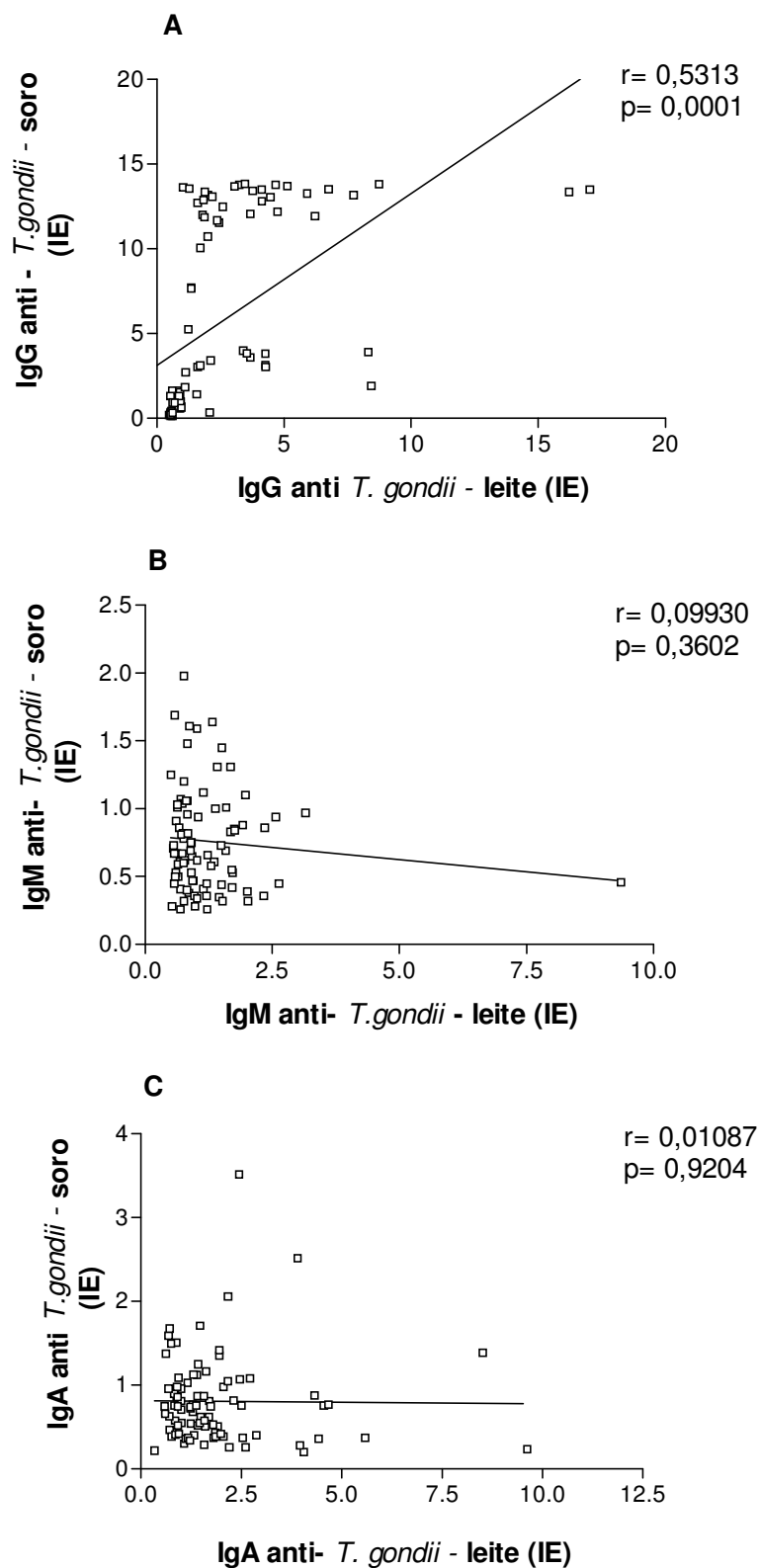


Figura 5. Correlação entre as classes de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA(C) anti-*T. gondii*, em amostras de soro e leite provenientes de puérperas do município de Uberlândia – MG, no período 2003-2005.

6- DISCUSSÃO

No presente estudo investigou-se a presença de anticorpos pertencentes às classes IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* paralelamente em amostras de soro e de leite de puérperas da cidade de Uberlândia-MG, utilizando-se os ensaios imunoenzimáticos ELISA, IFI e *Western-blot*.

Analisando-se os resultados obtidos pelos testes IFI, verificou-se que o número de amostras de soro positivas para IgG anti-*T. gondii* foi significativamente maior do que o número de amostras positivas de leite. Pode-se inferir a partir destes resultados que, para a detecção desta classe de anticorpo em amostras leite, o ensaio IFI provavelmente não seja um teste de escolha, uma vez que os seus resultados possam estar sendo influenciado por algum efeito inibitório que o presente trabalho não foi capaz de identificar.

Anticorpos da classe IgG foi o isotipo mais freqüentemente detectado nas amostras de soro. No leite, esse anticorpo foi encontrado em proporções semelhantes ao anticorpo IgA. Portanto, nossos resultados sugerem que provavelmente a maioria do isotipo IgG é transferido do plasma para a glândula mamária. No entanto, o mesmo não pode ser inferido em relação ao isotipo IgA, devido ao baixo grau de correlação deste isotipo encontrado entre as amostras de soro e de leite.

Os resultados do presente estudo permitem deduzir que provavelmente os anticorpos do isotipo IgA são seletiva e mais rapidamente transferidos do plasma para as glândulas mamárias. Esta hipótese está em consonância com o trabalho descrito por Chardès *et al* (1990) que teve como objetivo a detecção de IgG, IgM e IgA em amostras de soro e de leite de camundongos infectados por *T. gondii*, utilizando-se um ensaio ELISA modificado.

Em um trabalho prévio, onde se comparou os níveis de anticorpos das classes IgG e IgA em amostras de soro e de saliva, foi demonstrado que, ao contrário, os níveis de

anticorpos IgA anti-*T. gondii* presentes na saliva reflete basicamente níveis similares aos encontrados para este isotipo nas amostras de soro, enquanto que o mesmo não foi demonstrado em relação à presença do isotipo IgG anti-*T. gondii* nestes dois fluidos orgânicos (LOYOLA *et al*, 1997). Ao se comparar os resultados obtidos por estes autores com aqueles obtidos no presente estudo, pode-se inferir que provavelmente possa haver uma seletividade isotipo dependente no processo de transferência de anticorpos do soro para as glândulas salivares e mamárias.

Pareando-se as amostras de soro e leite e considerando-se os testes imunoenzimáticos ELISA, IFI e *Western-blot*, detectou-se IgG em 44,9% das amostras, mostrando que a IgG no soro pode ser secretada no leite. Esses resultados também foram encontrados no trabalho de Azab *et al.* (1992), onde foi utilizado apenas o teste IFI. De acordo com estes autores, baixos níveis de IgG do soro secretados no leite pode ser um fator protetor para o lactente.

Tem sido descrito que anticorpos específicos anti-*T. gondii* são protetores mediante a transferência passiva em animais experimentalmente infectados, sugerindo que anticorpos da classe IgA possa ter um papel fundamental de proteção evitando transmissão do parasito por via intestinal (VAN DE PERRE, 2003).

Considerando-se a detecção simultânea de IgG, IgA e IgM anti-*T.gondii* em uma mesma amostra, observou-se que para a maioria das amostras de soro e de leite houve uma predominância de anticorpos IgG, enquanto que para as amostras de leite houve um predomínio dos anticorpos das classes IgG e IgA concomitantemente. A maior ocorrência de IgG e IgA anti-*T. gondii* nas amostras de soro e de leite pode estar relacionada ao reconhecimento de vários antígenos em comum pelas duas classes de anticorpos, como foi previamente descrito no trabalho de Partanen *et al.* (1984) utilizando-se um *Western-blot*.

Em nosso estudo, por meio do *Western-blot* foi possível identificar anticorpos nas amostras de soro e leite dirigidos contra antígenos imunodominantes de *T. gondii*: Tg Sag1 (p30), Tg Sag2 (p22) e Tg Sag3 (p43). No trabalho de Chardès *et al.* (1990), ficou demonstrado que os anticorpos presentes em amostras de soro e de leite também reconheceram os antígenos imunodominantes p30 e p43. De acordo com estes autores, muitos dos antígenos reconhecidos por anticorpos da classe IgA presentes no leite foram também detectados por anticorpos da classe IgG.

Anticorpos IgG e IgA do leite reagem com os antígenos imunodominantes do parasito, sendo esse fato também observado tanto em amostras de secreção intestinal como no soro, sugerindo que aparentemente a produção de anticorpos em um determinado local possa apresentar atividade biológica em outros compartimentos do organismo infectado (CHARDÈS *et al.*, 2005; PARTANEN *et al.*, 1984).

Anticorpos do leite materno formam uma camada na superfície mucosa intestinal da criança, levando a uma proteção contra vários tipos de patógenos. A transferência de anticorpos específicos anti-*T. gondii* através do leite materno pode proteger o lactente (AZAB *et al.*, 1992; VAN DE PERRE, 2003). Em adultos, anticorpos IgA podem ser sintetizados por um ano ou mais, e além disso, são de menor valor diagnóstico em infecções recentes (MONTROYA ; LIESENFELD, 2004).

A detecção de anticorpos IgM anti-*T.gondii* como um marcador sorológico que possa ser definido como aquele isotipo cuja síntese aumenta rapidamente nas primeiras semanas de infecção, depois declina e desaparece, continua a ser um grande desafio para os sorologistas e clínicos. Isto porque com frequência são identificados casos de falsos resultados positivos e falsos resultados negativos, devido à diversidade da resposta imune dos hospedeiros infectados. No presente trabalho, nenhuma amostra de soro e leite analisada foi considerada simultaneamente reativa para o isotipo IgM. Estes resultados

muito provavelmente indicam que nenhuma das amostras analisadas possa ser considerada como provenientes de mulheres puérperas com infecção recente de *T. gondii*.

Todavia, observou-se que seis amostras isoladas de leite foram consideradas reativas para o isotipo IgM. Até o presente, não é possível afirmar que os níveis séricos de IgM não foram mensuráveis devido ao fato de que este isotipo possa ter sido transportado do plasma para a glândula mamária, como já foi descrito em modelos animais (GITLIN *et al*, 1976; FRENYO *et al*, 1987). Alternativamente, estes resultados podem estar diretamente relacionados à ocorrência de resultados falso-positivos nas amostras de leite, o que nunca foi descrito anteriormente.

Resultados falso-positivos e a persistência de títulos positivos, mesmo anos após o início da infecção, limitam a correta interpretação dos resultados obtidos em testes com anticorpos IgM (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Resultados de testes comerciais utilizados para detectar anticorpos IgM em laboratórios algumas vezes apresentam altas taxas de resultados falso-positivos, que pode atingir percentagens de até 60%. O que tem sido sugerido é a combinação de vários testes para aumentar a acuracidade dos resultados.

No presente estudo, o *Western-blot* foi empregado como um teste confirmatório. Devido ao alto grau de discordância obtido entre as amostras de leite nos testes ELISA e Imunofluorescência, pôde-se tomar uma posição em relação aos resultados falso-positivos por meio do teste *Western-blot*.

Baseando-se no fato de que anticorpos anti-*T. gondii* possam ser eficientemente transferidos do leite materno para o lactente, e que não há dados suficientes que comprovem a transmissão de *T. gondii* pelo leite, sugere-se que a amamentação não deve ser descontinuada dentre as mães soropositivas, uma vez que este fluido orgânico contém anticorpos de diferentes isotipos com atividade biológica contra este parasito, o que pode ter um efeito protetor relevante.

7- CONCLUSÕES

1. Os ensaios ELISA, IFI e *Western-blot* apresentam limiares de detecção diferentes, quando amostras de soro e de leite são analisadas paralelamente;
2. Os limiares de detecção destes ensaios são isotipo e fluido orgânico dependentes, sendo que o menor limiar de detecção foi observado para a detecção de IgG em amostras de leite pelo ensaio IFI;
3. Anticorpos IgG e IgA anti-*T. gondii* puderam ser detectados simultaneamente ou não nas amostras de soro e de leite por meio destes imunoenaios;
4. Houve uma frequência maior em relação à presença de anticorpos IgG nas amostras de soro estudadas, enquanto que as frequências de anticorpos IgG e IgA foram similares nas amostras de leite estudadas.
5. Anticorpos da classe IgM foram detectados em seis amostras de leite estudadas, sendo que nenhuma amostra de soro foi considerada reativa para este isotipo, sugerindo que a detecção deste isotipo neste fluido orgânico também pode causar os mesmos resultados falsos positivos das amostras reativas encontradas em amostras de soros.

8- RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório que é capaz de infectar muitas espécies pelo mundo. É estimado que um bilhão de pessoas seja infectado no mundo todo. A soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em mulheres e crianças varia entre 4% a 100%. O objetivo deste estudo foi detectar anticorpos IgG, IgM e IgA anti- *Toxoplasma gondii* e comparar a frequência destes isotipos nas amostras de soro e leite de mulheres puérperas em Uberlândia, MG, Brazil. Amostras de soro e leite foram obtidas simultaneamente entre 15 e 30 dias após o parto. As amostras foram testadas por enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI) e *Western - blot* (WB) para detectar anticorpos IgG, IgM e IgA anti - *T. gondii*. ELISA foi usado como teste de triagem, seguido por IFI, e amostras que apresentaram resultados discordantes para esses dois imunoenaios foram testadas por WB, utilizado como um teste confirmatório. Os anticorpos IgG e IgA foram detectados em 56,1% e 20,4%, respectivamente, nas amostras de soro. Os anticorpos IgG e IgA combinados foram detectados em 46,1% e 47,1% , respectivamente, nas amostras de leite. Nenhuma amostra foi reativa para IgM, isolada ou associada a outro isotipo. Considerando a falta de dados para provar a transmissão de *T. gondii* através do leite materno em humanos, e o fato de que mães infectadas podem transferir eficientemente anticorpos de diferentes isotipos para criança através do leite, é proposto que a amamentação deve ser continuada. No presente estudo, anticorpos IgG e IgA foram detectados em amostras de soro e leite. O anticorpo IgG foi o isotipo mais frequentemente detectado em amostras de soro e leite seguido pelo anticorpo IgA, com uma ocorrência significativamente menor. Nas amostras de leite, anticorpos IgA e IgG foram detectados em proporções semelhantes.

Palavras-chave: IgG; IgM; IgA; Leite; *Toxoplasma gondii*

9- ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that is able to infect many species throughout the world. It is estimated that plus one billion of people are infected worldwide. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women at childbearing age ranges from 4% to 100%. The aims of the present study were to detect IgG, IgM and IgA antibodies against *Toxoplasma gondii* and to compare the frequency of these antibody isotypes in serum and breast milk samples from lactating women in Uberlândia, MG, Brazil. Specimens of serum and breast milk were obtained simultaneously from each one between 15 and 30 days postpartum. Specimens were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect fluorescent antibody test (IFAT) and Western blot (WB) assay to detect IgG, IgM and IgA antibodies to *T. gondii*. ELISA was used as screening test, followed by IFI, and samples that presented discordant results were then assayed by WB as confirmatory test. The IgG and IgA antibodies were detected in 56,1% and 20,4%, respectively, in serum samples. The IgG and IgA combined were detected in 46,1% and 47,1% , respectively, in milk samples. No sample was reactive for IgM, lonely or with other isotype. Considering the lack of data to prove *T. gondii* transmission through maternal milk in humans and the fact that infected mothers can efficiently transfer antibodies from different isotypes to the child through the milk, it can be proposed that breast feeding should not be discontinued. In the present study, the IgG and IgA antibodies were detected in serum and milk samples. The IgG antibody was the most frequent isotype detected in serum samples followed by IgA in a significant lower occurrence. For milk samples, however, both IgA and IgG antibodies were detected in similar proportions.

Keywords: IgG; IgM; IgA; Milk; *Toxoplasma gondii*

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AMENDOEIRA, M.R.R. Mecanismo de Transmissão da Toxoplasmose. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, v. 155, p. 224-225. 1995.

AZAB, M.E.; KAMEL, A.M.; MAKLED, K.M.; KHATAB, H.; ZAYYAT, E.A; ABO-AMER, A.E.R.; SAMY, G. Naturally occurring *Toxoplasma* antibodies in serum and milk of lactating women. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 22, p.561-568. 1992.

BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. **Infection and Immunity**, v.62, p. 1761-1767.1994.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J.N.; KOGA DA SILVA, E.M.; MACEDO, Z.S. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 43, p.116. 1997.

CHAVES-BORGES, F.A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: Gráfica da Universidade Federal de Uberlândia, 1997, 55p.

CHARDÈS, T.; BOUGUIN, I.; MEVELEC, M.N.; DUBREMETZ, J.F.; BOUT, D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 1240 -1246. 1990.

¹Referências de acordo com a NBR-6023/2002. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Comissão de Estudo de Documentação, Rio de Janeiro.

DE CAMARGO, M.C.; ANTUNES, C.M.; CHIARI, C.A. Epidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in the municipality of Ribeirão das Neves, MG, I: Importance of domestic animal as source of *T. gondii* infection in humans. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.28, p. 204-211. 1994.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p. 267-299. 1998.

EL-ON, J.; PEISER, J. Toxoplasma and toxoplasmosis. **Harefuah**, v.142, p 48-55.2003.

FERREIRA; ÁVILA. **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 165-173.

FIGUEIREDO, J.F.; SILVA, D.A.; CABRAL, D.D.; MINEO, J.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats by the indirect haemagglutination, immunofluorescence and immunoenzymatic tests in the region of Uberlândia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 687-692. 2001.

FRENYO, V.L.; BUTLER, J.E.; WILSON, R.A.; KAVANAGH, J. The transport and metabolism of bovine IgM. **Molecular Immunology**, v. 24, p. 207-219. 1987.

GITLIN, J.D.; GITLIN, J.I.; GITLIN, D. Selective transfer of plasma proteins across mammary gland in lactating mouse. **The American Journal of Physiology**, v. 230, p. 1594-1602. 1976.

HERWALDT, B.L.; JURANEK, P.O. Laboratory- acquired Malaria, Leishmaniasis, Trypanosomiasis and Toxoplasmosis. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 313-323. 1993.

KONG, J.T.; GRIGG, M.E.; UYETAKE, L.; PARMLEY, S.; BOOTHROYD, J.C. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. **Journal of Infectious Diseases**, v.187, p. 1484-1495. 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685. 1970.

LOYOLA, A.M.; DURIGHETTO, A.F JR.; SILVA, D.A, MINEO, J.R. Anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulins A and G in human saliva and serum. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 26, p.187-191. 1997

LUFT, B.J.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical of Infectious Diseases**, v.15, p. 211-222. 1992.

LUNDE, M.N.; JACOBS, L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v.69, p. 806-808. 1983.

MCLEOD, R.; MACK, D.; BROWN C. *Toxoplasma gondii* - new advances in cellular and molecular biology - minireview. **Experimental Parasitology**, v.72, p. 109-121.1991.

MINEO, J.R.; CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v.27, p.283-287. 1980

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, p. 1965-1976. 2004.

NETO, E.C.; ANELE, E.; RUBIM, R.; BRITES, A.; SCHULTE, J.; BECKER, D.; TUUMINEN, T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3 year prospective neonatal screening study. **International Journal of Epidemiology**, v.29, p. 941-947. 2000.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia humana**. 10. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000. p. 164-176.

PARTANEN, P.; TURUNEN, H.J.; PAASIVUO, R.T.A.; LEINIKKI, P.O. Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M, and A antibodies at different stages of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, p. 133-135. 1984.

REICHE, E.M.V.; MORIMOTO, H.K.; FARIA, G.N.; HISATSUGU, K.R.; GELLER, L.; GOMES, A.C.L.F.; INOUE, H.Y.; RODRIGUES, G.; MATSUO, T. Prevalência de tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitário

Regional Norte do Paraná (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 519-527. 2000.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 321-334.

SEGUNDO, G.R.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERREIRA, M.S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 13-17. 2004.

SILVEIRA, C.; BELFORT, R.; BURNIER, M.; NUSSENBLATT, R. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retino-choroiditis in families. **American Journal of Ophthalmology**, v. 106, p. 362-364.1988.

SIMS, T.A.; TALBOT, I.C. An electron microscope and immuno-histochemical study of the intracellular location of *Toxoplasma gondii* cystis within the brains of mice with congenital toxoplasmosis. **Brazilian Journal of Experimental**, v.70, p. 317-325.1989.

SPEER, C.A.; TILLEY, M.; TEMPLE, M.E.; BLIXT, J.A.; DUBEY, J.P.; WHITE, M.W. Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense-granule protein GRA3 and form a unique parasitophorus vacuole. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.75, p. 75-86. 1995.

TABBARA, K.F. Ocular toxoplasmic encephalitis in person infected with human immunodeficiency virus. **International Ophthalmology Clinics**, v. 35, p. 15-29.1995.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 4350-4354. 1979.

VAN DE PERRE, P. Transfer of antibody via mother's milk. **Vaccine**, v.21, p. 3374-3376. 2003.

ANEXO I

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 194/04

Registro CEP: 140/04

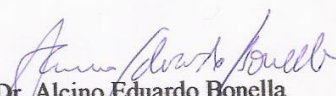
Projeto Pesquisa: *“Avaliação de tripeptídeos e tetrapeptídeos dos componentes Tg SAG-1, TgMIC-1 e Tg MIC-4 de toxoplasma gondii na detecção de anticorpos das classes IgM, IgA e IGG em amostras de soro de pacientes com toxoplasmose aguda e animais experimentalmente infectados”.*

Pesquisador Responsável: José Roberto Mineo

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação ética do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Uberlândia, 03 de setembro de 2004.


Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenador do CEP/UFU

ANEXO II

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 137/03

Uberlândia 07 de outubro de 2003

Ilustrada Sr(a)

Prof(a) Dr(a) Júlia Maria Costa Cruz

Prezadota/ Professor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia examinou e **APROVOU** o projeto de pesquisa **"Diagnóstico Imunoparasitológico da Estrongiloidíase através de amostras pareadas de fezes, soro e de leite humano de puérperas"** protocolado sob o número **91/2003**, do qual V.Sa. figura como pesquisador responsável, para ser desenvolvido a partir desta data.


Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenador do CEP/UFU

ANEXO III

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 294/05

Registro CEP: 140/04

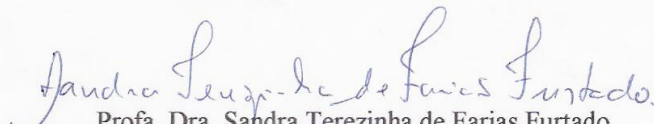
Projeto Pesquisa: "Avaliação de tripeptídeos e tetrapeptídeos dos componentes TgSAG-1, TgMIC-1 e TgMIC-4 de *Toxoplasma gondii*, na detecção de anticorpos das classes IgM, IgA e IgG em amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda e animais experimentalmente infectados"

Pesquisador Responsável: José Roberto Mineo

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do adendo ao projeto.

Situação: Projeto aprovado

Uberlândia, 25 de outubro de 2005.


Profª. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU