

## ANTICORPOS ANTI-TOXOPLASMA GONDII EM DOADORES DE SANGUE

Fausto Gonçalves de ARAUJO (1)

### RESUMO

Reações de Sabin-Feldman (RSF) e Imunofluorescência Indireta (RIF), isoladas ou associadas, foram realizadas em 729 amostras de soro provenientes de doadores de sangue ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais em Belo Horizonte. Em todos os testes, considerando a diluição do soro de 1:16 ou mais como título indicativo de infecção pelo *Toxoplasma gondii*, foram detectados 371 reagentes, fornecendo percentual de 50,3%. O teste isolado de Sabin-Feldman foi o que mostrou percentual de reagentes mais baixo, 48,9%, ao passo que a associação RSF e RIF mostrou 52,0% de reativos. Observou-se boa concordância entre a RSF e a RIF na mesma amostra de soro. A RIF mostrou-se algo mais sensível.

Títulos de 1:4096 foram encontrados, através da RIF, em indivíduos aparentemente assintomáticos.

Comenta-se a interpretação clínica de títulos suspeitos, acima de 1:256, sugerindo-se a repetição periódica dos testes (RSF ou RIF). Discute-se também o significado das positivities em baixas diluições.

### INTRODUÇÃO

Dois dos pontos bastante controversos dentro do estudo da infecção humana e animal pelo *Toxoplasma gondii* residem principalmente, no aspecto de sua transmissão e no valor diagnóstico representado pelas reações sorológicas para a caracterização da doença causada. Juntamente com a transmissão congênita já provada<sup>24</sup>, outras suposições tem sido feitas, culminando com o recente trabalho de HUTCHINSON<sup>17</sup> a respeito da possibilidade da transmissão deste protozoário através dos ovos infetados de helmintos da família *Anisakidae*, gênero *Toxocara*. Dentro das relatadas possibilidades de transmissão, uma delas tomou aspecto bastante palpável com o trabalho de AMATO NETO & col.<sup>2</sup> a respeito do

encontro de *T. gondii* em sangue destinado a transfusão.

Com referência aos testes sorológicos desenvolvidos para o diagnóstico da toxoplasmose, a reação de SABIN-FELDMAN<sup>25</sup> (RSF) é reconhecida como apresentando boa especificidade<sup>13, 21</sup>. Outros testes como a Hemaglutinação passiva<sup>9, 20</sup> e, recentemente, a reação de Imunofluorescência indireta (RIF) têm mostrado estreita concordância com a RSF, sendo, por isso, bastante aconselhados devido a problemas técnicos<sup>9, 11, 12, 20</sup>.

A incidência de sorologia positiva para *Toxoplasma gondii* varia intensamente de país a país e, dentro de uma mesma região, entre grupos étnicos considerados<sup>19</sup>. Trabalhos re-

Trabalho realizado com o auxílio do Conselho de Pesquisas da Universidade Federal de Minas Gerais

(1) Assistente. Departamento de Parasitologia (Chefe: Prof. Wilson Mayrink), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

centes<sup>28, 29</sup> tem mostrado que a variação da sorologia positiva depende possivelmente também de fatores econômico-sociais e fatores ligados à topografia regional.

Em nosso país, embora inquéritos sorológicos tenham sido realizados<sup>7, 23, 29</sup>, inclusive em populações de aborígenes<sup>7</sup>, os dados são ainda precários, principalmente, em se tratando de doadores de sangue. Neste particular encontramos o trabalho de NUSSENZWEIG<sup>23</sup> que utilizou a reação de Sabin-Feldman. No exterior salientamos trabalho recente de ZARDI & col.<sup>30</sup> também referente a doadores de sangue na Itália.

O presente trabalho tem por finalidade apresentar dados relativos à sorologia positiva em doadores de sangue da região de Belo Horizonte, MG.; mostrar algumas observações sobre a concordância da RSF e RIF, e, ainda, comentar a respeito do valor diagnóstico dos títulos sorológicos observados.

#### MATERIAL E MÉTODOS

O material constou de 729 amostras de soro obtidas no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras eram mantidas em temperatura de -20°C e, geralmente, testadas no dia subsequente ao seu recebimento. Todas as amostras foram inativadas a 56°C durante 30 minutos. Não foi adicionada nenhuma substância preservativa ao soro.

*Reação de Sabin-Feldman (RSF)* — Foi utilizada a técnica proposta por BROOKE & SULZER<sup>10</sup> com diluição do soro à razão de 4 a partir de 1:16 até 1:4096. Como antígeno para este teste foi utilizada uma cepa de *T. gondii* denominada VET e por nós isolada, em 1964, de cão com toxoplasmose ativa cerebral, sendo mantida desde esta data por passagens sucessivas em camundongo branco. Esta cepa mostra-se altamente virulenta para estes animais, matando-os em 4-5 dias após inoculação intraperitoneal. O exudato peritoneal, rico em formas proliferativas do parasita, era colhido no terceiro dia de infecção com auxílio de seringa contendo aproximadamente 0,05 ml de heparina ou solução de citrato de sódio a 3,8%.

*Reação de Imunofluorescência indireta (RIF)* — Em linhas gerais utilizamos a técnica descrita por CHERRY & col.<sup>14</sup>, adotando-se a modificação proposta por AMBROISE-THOMAS & col.<sup>3</sup> referente ao emprego do azul de Evans como coloração contrastante.

Os soros foram diluídos à semelhança da RSF até a diluição de 1:1024. A partir desta apenas dobrávamos a diluição até atingir 1:8192. Como antígeno utilizamos a mesma cepa de *T. gondii* empregada para a RSF. Os toxoplasmas eram colhidos aos três dias de infecção após injeção na cavidade peritoneal de 3 ml de salina estéril, desprezando-se o exudato que era extraído com alguma quantidade de sangue.

O "pool" de vários camundongos era colocado em frasco e adicionado formol até concentração final de 1% e a seguir deixado em temperatura ambiente por 30 minutos e depois centrifugado durante 20 minutos a 2.000 rpm. Em continuação o sedimento obtido era resuspenso em salina tamponada com fosfatos de pH 7,0 e homogeneizado com auxílio de uma seringa munida de agulha 10/5. Centrifugado novamente em baixa rotação, desprezando-se o sedimento contendo a grande maioria das células do exudato. Novamente era centrifugado o sobrenadante (20 minutos, 2.000 rpm). Este último sedimento, agora contendo quase que exclusivamente toxoplasmas, era resuspenso de maneira a fornecer um número adequado de parasitas e uma gota do material distribuída em lâminas quadrículadas. Estas eram secas sob ventilador, envoltas em papel aluminizado e guardadas em congelador a -20°C.

Duas partidas de conjugado anti-globulina humana foram empregadas ambas de acordo com a técnica de CHERRY & col.<sup>14</sup>, na qual o excesso de fluorocromo é retirado através de diálise.

Ambas as partidas foram preparadas após inoculação, em coelho e cabra, de gamaglobulina total, sem prévio fracionamento em IgG e IgM, e utilizando adjuvante de Freund incompleto. O conjugado proveniente de soro de cabra foi empregado em pelo menos 90% dos testes e era diluído a 1:60. Foi preparado com isotiocianato de fluoresceína NBC (Nutritional Biochemical Co.) n.º 9922, de

pureza 93% e calculado de modo a fornecer um índice F/P ao redor de 18.

O equipamento de microscopia é de marca Zeiss Jena com fonte de luz ultravioleta OSRAM HBO200 e filtros BG12 e OGI de excitação e barreira, respectivamente. O microscópio é monocular e munido de condensador de campo escuro.

Os testes de Sabin-Feldman e Imunofluorescência indireta na mesma amostra de sôro eram realizados simultaneamente, porém por pessoal e em local diferentes. Os resultados foram comparados somente ao final do trabalho.

#### RESULTADOS

As 729 reações realizadas mostraram 371 resultados positivos à diluição de 1:16 ou mais, conforme distribuição no Quadro I. As

diluições positivas mais baixas foram as que surgiram com maior freqüência, tanto nos testes isolados como quando houve associação de reações (Quadros II, III e IV).

Observamos boa concordância entre a RSF e a RIF, principalmente em diluições abaixo de 1:1024. Acima desta a RIF mostrou-se mais sensível (Quadro IV). As reações positivas nas respectivas diluições, independentemente de qual o teste realizado, são mostradas no Quadro V.

#### DISCUSSÃO

Todos os doadores de sangue recebidos pelo Hospital das Clínicas da U.F.M.G. são, pouco antes da coleta de sangue, submetidos a um exame clínico sumário, o qual consta de obtenção de dados relativos a enfermidades anteriores, pressão arterial e presença de

#### QUADRO I

Número de reações com o percentual e número de positivos de acôrdo com o teste realizado

Teste	N.º reações	N.º positivos	% positivos
Sabin-Feldman	196	96	48,9
Imunofluorescência	410	206	50,2
Sabin-Feldman e Imunofluorescência	123	69	52,0
Total	729	371	50,3

#### QUADRO II

Teste de Sabin-Feldman. Número e percentual de reativos de acôrdo com a diluição do sôro

Diluição	N.º reativos	% reativos
1:16	42	43,7
1:64	36	37,5
1:256	11	11,5
1:1.024	5	5,2
1:2.048	2	2,1
Total	96	100,0

#### QUADRO III

Teste de imunofluorescência. Número e percentual de reativos de acôrdo com a diluição do sôro

Diluição	N.º reativos	% reativos
1:16	94	45,6
1:64	70	34,0
1:256	25	12,1
1:1.024	12	5,8
1:2.048	4	2,0
1:4.096	1	0,5
Total	206	100,0

QUADRO IV

Distribuição dos soros, com referência aos títulos das reações de Sabin-Feldman e Imunofluorescência indireta na mesma amostra

Títulos de Sabin-Feldman	Títulos de Imunofluorescência							Total
	Negativo	1:16	1:64	1:256	1:1.024	1:2.048	1:4.096	
Negativo	53	4						57
1:16	1	10	16	2				29
1:64		2	5	2				9
1:256				11	7			18
1:1.024				1	6	2	1	10
Total	54	16	21	16	13	2	1	123

QUADRO V

Distribuição dos positivos em todos os testes de acordo com o título

Título	N.º positivos	% positivos *
1:16	152	40,97
1:64	127	34,23
1:256	52	14,01
1:1.024	30	8,08
1:2.048	8	2,16
1:4.096	2	0,05
Total	371	100,0

\* Percentual aproximado

anemia e icterícia. Afora os testes comuns de Bancos de Sangue, todas as amostras são submetidas ao teste de Guerreiro-Machado. Não se faz nenhuma observação clínica referente a linfadenopatias, embora, segundo o consenso geral, seja esta uma das manifestações mais comuns da Toxoplasmose adquirida<sup>1, 8</sup>.

O *Toxoplasma gondii* foi isolado por AMATO NETO & col.<sup>2</sup> de um doador que apresentava título de 1:4.096 na RSF. Em nossa cá-

suística, no grupo em que empregamos somente a RSF, tivemos oportunidade de verificar duas amostras com título de 1:2.048, comprovado após mostrarem-se superiores a 1:1.024 e inferiores a 1:4.096. Quando associamos as duas reações, RSF e RIF, obtivemos 1:1.024 como título máximo de RSF e 1:4.096 de RIF. Neste particular nossas observações concordam com as de outros pesquisadores<sup>11, 27</sup> de que a RIF mostra-se mais sensível que a RSF, evidenciando títulos mais altos.

As nossas amostras foram provenientes de doadores cuja idade variou entre 18 e 56 anos.

Todavia, a maioria encontrava-se em uma faixa etária ao redor de 26 anos, motivo pelo qual não nos foi possível estabelecer uma relação entre os títulos e a idade.

Utilizando o teste de hemaglutinação e considerando o título de 1:256 como significativo, WALLS & KAGAN<sup>29</sup> encontraram um percentual de 14% de reativos para a região de Minas Gerais. Estes pesquisadores trabalharam com amostras de soro provenientes de recrutas do Exército Nacional, ou seja, de indivíduos masculinos de idade variando em torno de 18 anos.

Em nosso caso, se considerarmos como reações significativas aquelas de título de 1:256 ou mais, à semelhança de WALLS & KAGAN, em todos os testes, obteremos um percentual de 12,6%.

Nossas amostras provieram de doadores residentes em Belo Horizonte ou proximidades, onde a altitude, embora apresente variações, quase nunca está abaixo de 300 metros. Não nos foi possível, pois, estabelecer uma relação sorologia positiva/altitude, à semelhança do que foi realizado em outros trabalhos<sup>28, 29</sup>.

Um ponto merecedor de maior discussão entre os que se dedicam ao estudo do *T. gondii* é o que se refere à relação entre o título da reação sorológica e a sintomatologia clínica da doença causada<sup>13, 21, 26</sup>. Algumas observações que estão sendo coletadas em nossa região<sup>4</sup> sugerem que linfadenopatias e febre prolongada podem estar frequentemente associadas a uma sorologia superior a 1:1.024. Em alguns pacientes com estes sintomas temos encontrado, na RIF, títulos que vão, às vezes, até ao redor de 1:65.000. Todavia, em indivíduos absolutamente assintomáticos temos encontrado títulos bastante elevados que podem mesmo indicar o estabelecimento de terapêutica específica. Ao nosso modo de ver, tendo em vista alguns problemas ligados à medicação atualmente preconizada para a toxoplasmose, os dados sorológicos devem ser sempre associados a uma observação clínica cuidadosa. Não se pode afirmar com certeza qual o título sorológico indica doença ativa.

Seria aconselhável, quando se encontra um título suspeito, digamos 1:256 ou mais, na ausência de sintomas, que se repetisse a sorologia periodicamente com a finalidade de observar a permanência ou alguma alteração do título.

As baixas diluições positivas também representam problema quanto à sua interpretação.

Algumas observações em testes cruzados em animais sugeriram alguma participação do *Sarcocystis* sp. na produção de anticorpos semelhantes aos que são produzidos pelo *T. gondii* e evidenciados através da reação de Sabin-Feldman. GARNHAM<sup>16</sup>, acentuando a frequência do *Sarcocystis* sp. em animais na Inglaterra, emite a hipótese de que este agente poderia imunizar passivamente o homem através da ingestão dos mesmos, com consequente sorologia positiva na RSF. AWAD<sup>5</sup>, AWAD & LAINSON<sup>6</sup> e MÜHLFORDT<sup>22</sup> concluíram que o teste do corante pode eviden-

ciar anticorpos produzidos pelo *Sarcocystis* sp. em animais e que esporozoítos de *S. tenella* podem ser utilizados na realização do teste de Sabin-Feldman em substituição às formas proliferativas do *T. gondii*<sup>5</sup>. Convém assinalar que embora estes Autores tenham observado reações cruzadas na RSF, na reação de fixação do complemento tal fato não ocorreu, podendo as duas infecções ser diferenciadas através da mesma.

Todavia, os trabalhos destes Autores são ainda sujeitos a dúvidas, como atesta o trabalho de CATHIE<sup>13</sup> e, recentemente, JAMRA & col.<sup>18</sup>.

O *Sarcocystis lindemani* tem sido encontrado parasitando esporadicamente o homem<sup>15</sup>, sendo geralmente um achado de necropsia. Não temos conhecimento de nenhuma pesquisa sistemática destinada a fornecer dados sobre a prevalência deste protozoário no homem. Como a infecção humana é geralmente assintomática é natural que haja pouco interesse a respeito.

Em animais, em nosso meio, a infecção pelo *Sarcocystis* sp. é muito comum<sup>4, 18</sup>. Também a sorologia positiva para *T. gondii*, em baixa diluição, é muito freqüente em animais testados através da RSF, mesmo com a inativação do soro a 56°C, durante 60 minutos<sup>4</sup>.

Achamos necessário maiores pesquisas a respeito da relação *Sarcocystis*/sorologia positiva para *T. gondii*, pois caso as observações de AWAD<sup>5</sup>, AWAD & LAINSON<sup>6</sup>, MÜHLFORDT<sup>22</sup> e a hipótese de GARNHAM<sup>16</sup> sejam confirmadas poder-se-ia explicar mais facilmente a alta prevalência de sorologia positiva para *T. gondii*, em baixas diluições, no homem, evidenciada geralmente através da RSF.

#### SUMMARY

#### *Anti-Toxoplasma gondii* antibodies in blood donors

The Sabin-Feldman's test (RSF) and the Indirect Immunofluorescent test (RIF), either alone or associated, were used to search for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in 729 serum samples from blood donors to the "Hospital das Clínicas", Federal University

of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. It was found that 371 samples gave positive reaction in the 1:16 or higher dilutions of the serum showing 50.3% of reactives.

A good agreement between the RSF and RIF was observed, although the RIF seemed to be more sensitive specially in the high dilutions. It was found that 40 samples showed titers ranging from 1:1,024 to 1:4,096 but the respective donors did not show any suggestive symptomatology of acquired toxoplasmosis.

The 1:256 or higher titers sometimes do not indicate active disease. When these titers are found a very accurate clinical examination should be performed, and in absence of any suspected symptom the test must be repeated periodically in order to detect any variations in titer. It was suggested that *Sarcocystis* sp., which is very common in animals in this region, could play a role in the generation of low dilution human reactives.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Dr. J. A. Tavares, do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da UFMG, pelas facilidades postas à nossa disposição para a obtenção das amostras de sangue.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO Neto, V.; RIVETTI, F. S. & MALHEIROS JUNIOR, O. — Concomitância de casos de toxoplasmose adquirida, forma linfoglandular, em habitação coletiva na cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:73-78, 1967.
2. AMATO Neto, V.; COTRIM, J. X.; LAUS, W. C. & GOMES, M. C. O. — Nota sobre o encontro de *Toxoplasma gondii* em sangue destinado à transfusão. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5:68-69, 1963.
3. AMBROISE-THOMAS, P.; GARIN, J. P. & RIGAUD, A. — Amélioration de la technique d'immunofluorescence par l'emploi de contre colorants. Application aux Toxoplasmes. *Presse Med.* 74:2215-2216, 1966.
4. ARAUJO, F. G. — Dados não publicados.
5. AWAD, F. I. — A new dye test for Toxoplasma and Sarcocystis infections by use of *Sarcocystis tenella* spores. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 48:337-341, 1954.
6. AWAD, F. I. & LAINSON, R. — A note on the serology of Sarcosporidiosis and Toxoplasmosis. *J. Clin. Path.* 7:152-156, 1954.
7. BARUZZI, R. G. & AMATO Neto, V. — Inquérito sorológico sumário para Toxoplasmose entre índios do Parque Nacional do Xingu. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:277-280, 1966.
8. BEATTIE, C. P. — Clinical and epidemiological aspects of Toxoplasmosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 51:96-103, 1957.
9. BEN-RACHID, M. S. — Sur la technique de séro-diagnostic de la Toxoplasmose par hématagglutination passive. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 40:393-401, 1965.
10. BROOKE, M. M. & SULZER, A. J. — Directions for performing Sabin-Feldman cytoplasm-modifying (methylene blue dye) test for Toxoplasmosis. *Public Health Lab.* 13:136-147, 1955.
11. CAMARGO, M. E. — Comparative evaluation of Toxoplasmosis indirect fluorescent and Sabin-Feldman dye tests in a thousand human sera. A few unexpected results. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:62-68, 1966.
12. CAPPONI, M. — Constatations personnelles pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par immunofluorescence. *Bull. Soc. Path. Exot.* 59:77-83, 1966.
13. CATHIE, I. A. B. — An appraisal of the diagnostic value of the serological tests for toxoplasmosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 51:104-110, 1957.
14. CHERRY, W. B.; GOLDMAN, M. & CARSKI, T. R. — Fluorescent antibody techniques in the diagnosis of communicable diseases. U. S. Dept. Health, Education and Welfare. *Public Health Service Publication* no. 729, 1960.
15. FAUST, E. C. & RUSSELL, P. F. — *Clinical Parasitology*. Philadelphia, Lea and Febiger, 1964, pp. 283.
16. GARNHAM, P. C. C. — Introduction to a Symposium on Toxoplasmosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 51:93-95, 1957.
17. HUTCHINSON, W. M. — The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61:80-89, 1967.
18. JAMRA, L. F.; DEANE, M. P. & GUIMARAES, E. C. — On the isolation of *T. gondii* from human food of animal origin. Partial results in the city of São Paulo (Brazil). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:169-176, 1969.

19. KESSEL, J. F.; LEWIS, W. P. & JACOBS, L. — Toxoplasmic antibodies in Southern California and Polynesia. *Hawaii Med. J.* 25: 141-144, 1965.
20. LUNDE, M. N.; JACOBS, L. & WOOD, R. M. — Comparison of dye and haemagglutination tests on sera of suspected cases of toxoplasmic uveitis. *Arch. Ophthalm.* (Chicago) 69: 10-12, 1963.
21. MAS-BAKAL, P. — The specificity of Sabin-Feldman's dye test in the diagnosis of Toxoplasmosis. *Trop. Geogr. Med.* 14:56-66, 1962.
22. MÜHLPFORDT, H. — The response of animals infected with Sarcosporidia to Sabin-Feldman's dye test for Toxoplasmosis. *Trop. Dis. Bull.* 49:322, 1952.
23. NUSSENZWEIG, R. S. — Toxoplasmose: inquérito sorológico feito pela prova do corante em doadores de sangue. *Hospital* (Rio) 51:723-728, 1957.
24. REMINGTON, J. S.; JACOBS, L. & MELTON, M. L. — Congenital transmission of Toxoplasmosis from mother animals with acute and chronic infections. *J. Infect. Dis.* 108: 163-173, 1961.
25. SABIN, A. B. & FELDMAN, H. — Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108:660-663, 1948.
26. SABIN, A. B.; FELDMAN, H.; EICHENWALD, H. & JACOBS, L. — Present status of clinical manifestations of Toxoplasmosis in man. Indications and provisions for routine serologic diagnosis. *J.A.M.A.* 150:1061-1066, 1952.
27. WALTON, B. C.; BENCHOFF, B. M. & BROOKS, M. — Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 15:149-152, 1966.
28. WALTON, B. C.; ARJONA, I. & BENCHOFF, B. M. — Relationship of toxoplasma antibodies to altitude. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 15:492-495, 1966.
29. WALLS, K. W. & KAGAN, I. G. — Studies on the prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii*. 2. Brazil. *Amer. J. Epidem.* 36: 305-313, 1967.
30. ZARDI, O.; D'ARCA, S. U.; DRISALDI, D.; GRAZIANO, F. & VINDITTI, G. — Diffusione dell'infezione da *T. gondii* in donatori e non donatori de sangue residenti in Roma e nell'agro romano. *Trop. Dis. Bull.* 65:70-71, 1968.

Recebido para publicação em 15/7/1969.