

Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres, atendidas nas unidades da rede de saúde pública da região metropolitana de São Paulo (2001-2005)

Frequency of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in women attended at public health center network of São Paulo metropolitan region (2001-2005)

RIALA6/1105

Massami KAWARABAYASHI, Débora Picanço AURELIANO, Maria Lúcia RAYMUNDO, Rosângela Aparecida GARCIA, Thaís Alves da COSTA-SILVA, Katia Gomes CASTELLÃO, Helena Hilomi TANIGUCHI, José Eduardo TOLEZANO, Roberto Mitsuyoshi HIRAMOTO*

*Endereço para correspondência: Seção de Parasitoses Sistêmicas, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo 355, 8º Andar, CEP 01246-000 São Paulo/SP. Fone: (0xx11) 3068-2891. Fax: 3085-3505. E-mail: rmhiramoto@ial.sp.gov.br.
Recebido: 16/03/2007 – Aceito para publicação: 10/05/2007

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório que pode infectar o homem e animais homeotérmicos. Nos indivíduos imunocompetentes a infecção é geralmente assintomática, os principais grupos atingidos gravemente pela doença são os indivíduos imunodeprimidos e as gestantes que adquirem a infecção durante a gestação. Neste trabalho foram analisadas 1485 amostras de soros de mulheres atendidas na rede pública de saúde da grande São Paulo, durante o período de janeiro de 2001 a julho de 2005. A detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) e a técnica Imunofluorescência Indireta (IFAT) foi utilizada para detecção de anticorpos IgM e IgG anti- *T. gondii*. Das amostras analisadas 57,10% apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii*, e 1,95% possuíam anticorpos específicos da classe IgM. Os inquéritos epidemiológicos realizados no Brasil demonstraram que a soroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* varia de 40 a 80%, o que corroboram com os dados obtidos no presente estudo. Existe a necessidade de estudos que identifiquem as taxas de prevalência nas várias regiões brasileiras, com o intuito de implantar trabalhos de informação e conscientização da população para diminuição do risco de infecção congênita por *T. gondii*.

Palavras-chave. *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose, sorologia, IgG, IgM.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasite that can infect man and homoeothermic animals. In immunocompetent individuals the infection is generally asymptomatic, the foremost groups seriously affected by the infection are the immunocompromised and the pregnant women who acquire the infection during pregnancy. In this survey were analyzed 1485 serum samples from women attended at public health network of São Paulo metropolitan region during the period of January 2001 to July 2005. The detection of IgG antibody anti-*T. gondii* was realized by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), both IgG and IgM antibodies were detected by immunofluorescent antibody technique (IFAT). Among the samples analyzed 57.10% presented IgG antibody anti-*T. gondii* and IgM antibody was detected in 1.95% individuals. Previous epidemiologic studies performed in Brazil demonstrated an IgG anti-*T. gondii* antibody seroprevalence varying from 40% to 80%, which corroborate with the date of the present investigation. There is the necessity of the studies to estimate the *T. gondii* infection prevalence rate in several Brazilian regions, in order to establish a developing health education strategies, and information programs for population to decreased congenital infection risk.

Key words. *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, serology, IgG, IgM.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia e ordem Eucoccidia¹ que pode infectar o homem e uma ampla variedade de animais domésticos e selvagens². Os felinos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii*, é no intestino desses animais que ocorre a reprodução sexuada e a liberação de oocistos nas fezes que ao serem ingeridos junto com água ou alimentos por mamíferos e aves, liberam os esporozoítos no intestino. Estes após invasão celular transformam-se em taquizoítos que disseminarão no organismo e formarão os bradizoítos e conseqüentemente cistos teciduais que poderão permanecer nos seus hospedeiros por longos períodos^{3,4}. Os felinos e outros animais poderão se infectar pela ingestão de carne contaminada, fechando o ciclo. O parasita, apesar de infectar com frequência o homem, causa geralmente doença benigna, sendo a toxoplasmose ocular um dos agravos em indivíduos imunocompetentes⁵. Pacientes imunodeprimidos, como portadores do vírus HIV e transplantados podem sofrer doença severa levando inclusive ao óbito^{6,7}. Outro grupo que pode ser atingido gravemente pela doença são os fetos de mães que nunca tiveram contato com o parasita, quando isto ocorre pode levar ao aborto ou causar lesões irreversíveis no feto, conhecidas como tríade de Sabin^{8,9}. Na região metropolitana de São Paulo, Brasil, estima-se que devam nascer cerca de 230 a 300 crianças infectadas por ano¹⁰, mas a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* no Brasil é variável e depende da região, hábitos e fatores sócio-econômicos. O presente trabalho tem como objetivo relatar a situação do perfil da toxoplasmose, através das técnicas de Imunofluorescência (IFAT) e Ensaio imunoenzimático (ELISA), das pacientes atendidas na rede pública de saúde do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra de sangue

Foram analisadas 1485 amostras de soros de mulheres atendidas na rede pública de saúde da grande São Paulo, durante o período de janeiro de 2001 a julho de 2005.

T. gondii

Os parasitas utilizados foram taquizoítos da cepa RH, que são mantidos rotineiramente na Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz, por meio de passagens sucessivas em camundongos Swiss (não isogênicos) com o peso variando entre 20 e 22 gramas, por meio de lavagem do peritônio com solução salina ou salina tamponada com fosfato - NaCl 0,15M/tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS) e subsequente inóculo intraperitoneal (i.p.) em novos animais ou sendo mantido em estabilato de nitrogênio líquido.

Imunofluorescência indireta (IFAT)¹¹

Os parasitas coletados do peritônio dos camundongos foram centrifugados a 800g durante 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o precipitado suspenso em formol 2% tamponado com fosfato de sódio 0,02M pH 7,2, permanecendo em estufa a 37°C por 30 minutos. A seguir, o material foi novamente centrifugado a 800g, o sobrenadante desprezado e o precipitado suspenso em PBS. Em lâminas limpas, era adicionado 20µl (1.10⁴ parasitas) do preparado em cada orifício da lâmina de imunofluorescência. Após secagem cuidadosa, as lâminas foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

Para cada amostra de soro foram preparadas cinco diluições para IgG (1/16, 1/256, 1/1024, 1/2048 e 1/4096) e duas para IgM (1/4 e 1/32) a título de triagem. Nas amostras positivas para IgM foi aplicado em cada amostra o reagente para remover o fator reumatóide (Chemicon®), realizando dez diluições (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 e 1/5120). A diluição do soro foi depositada em cada orifício da lâmina de fluorescência em PBS, contendo taquizoítos formolizados e aderidos; seguiu-se incubação em câmara úmida por 30min a 37°C. Após a primeira incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS por 10min. Em seguida, cada orifício foi recoberto com soro anti-IgG ou anti-IgM humano, produzido em cabra e conjugado ao Isotiocianato de Fluoresceína-FITC (Biolab-Merieux), diluído em solução de Azul de Evans 0,01% em PBS, com incubação a 37°C, ao abrigo da luz, por 30min. As mesmas foram novamente lavadas duas vezes em PBS por 10min, para remoção do excesso de conjugado, secas e montadas com preservativo (Glicerol-PBS 9:1) sob lamínula para observação. A observação foi realizada em microscópio de epifluorescência com lâmpada de mercúrio de 100V (Nikon Eclipse E400), com sistema de filtros para fluoresceína, sendo considerada positiva a diluição em que os taquizoítos apresentassem uma clara fluorescência verde na membrana celular, contra o fundo vermelho das formas coradas pelo Azul de Evans. O título foi considerado a maior diluição de soro com reação positiva.

Ensaio Imunoenzimático - ELISA¹²

Placas de 96 poços (Multiwell Plate/polystyrene - Sigma®) foram sensibilizadas com 100µl de antígeno na concentração de 1µg/ml em tampão carbonato 0,1M pH 9,0 durante 12 - 18h a 4°C. A seguir, foram lavadas com PBS + 0,02% Tween 20 (Sigma®) (PBST) + leite desnatado 0,3% (PBSTL) e incubadas com PBSTL por 1 hora em câmara úmida à temperatura de 37°C, para bloqueio de eventuais sítios inespecíficos de ligação. Após novo ciclo de lavagens com PBSTL, foram adicionadas as amostras de soro, 100µl/cavidade, diluídos a 1:500 em PBSTL e incubadas a 37°C em câmara úmida por 1 hora. Após novo ciclo de lavagens com PBSTL, acrescentou-se conjugado de coelho anti-IgG humano (Sigma®), conjugado a peroxidase (100µl/cavidade), na diluição 1/3.000 em

PBSTL. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida, seguida de novo ciclo de lavagens com PBST. A reação foi revelada pela adição de 100µl/cavidade de solução cromogênica OPD (o - phenylenediamine 1mg/ml, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5.0). Após 30 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de HCl 4N (50µl/cavidade). A densidade óptica (D.O.) foi obtida por leitura a 492nm em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan MS).

RESULTADOS

Os resultados demonstraram que 57,10%, ou seja, 848 das 1485 pacientes atendidas no período apresentaram anticorpos IgG anti-*T.gondii* detectados por ELISA. Todas as amostras analisadas por ELISA foram tituladas por meio de Imunofluorescência Indireta e houve concordância entre ambas às técnicas.

A porcentagem de amostras positivas para anticorpos IgG anti-*T. gondii* por ano, entre 2001 e 2005 foi sempre superior a 50%, como demonstrado na Figura 1.

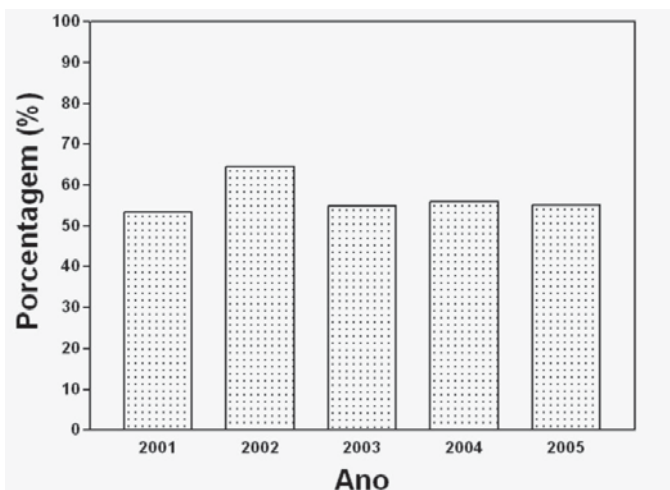


Figura 1. Distribuição anual das 848 amostras positivas de mulheres atendidas na rede pública de saúde de São Paulo, positivas para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, no período de 2001 a 2005, detectados por ELISA e IFAT.

Quando as amostras positivas são distribuídas por faixa etária, pode-se observar um aumento da porcentagem de positividade conforme a faixa etária, com incidência anual de 0,6 ± 0,11% (Figura 2).

Foram detectadas por IFAT 1,95% (29 pacientes) com anticorpos IgM. Na Figura 3 foram correlacionados os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* IgM com os da classe IgG, demonstrando parte das pacientes que apresentaram anticorpos IgM possuíam altos títulos de anticorpos IgG e outra parte títulos baixos.

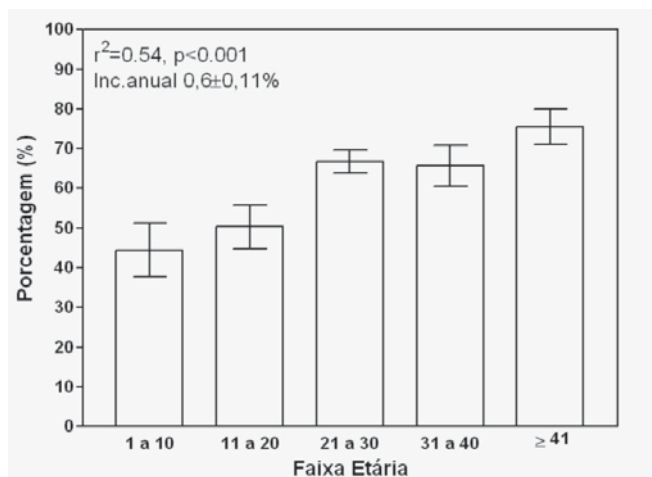


Figura 2. Distribuição por faixa etária das 848 amostras positivas de mulheres atendidas na rede pública de saúde de São Paulo, positivas para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, no período de 2001 a 2005, detectados por ELISA e IFAT.

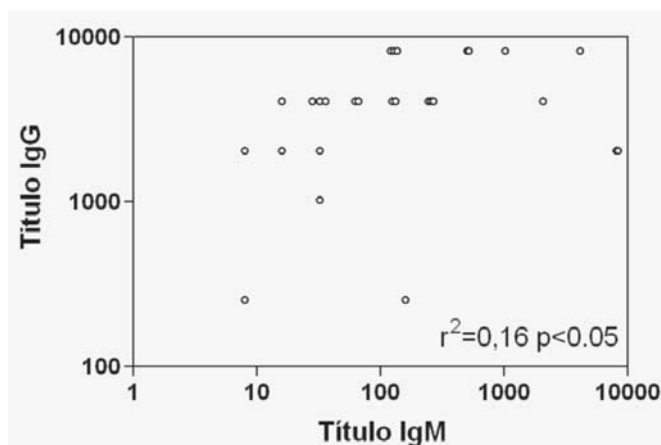


Figura 3. Títulos de anticorpos anti-*T. gondii* IgM (29 pacientes) correlacionados com os da classe IgG das pacientes atendidas na rede pública de saúde no período de 2001 a 2005, detectados por IFAT.

DISCUSSÃO

Inquéritos no Brasil têm mostrado que a taxa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* varia de 40 a 80%^{13,14,15,16}, o que corroboram os dados obtidos em nossos ensaios, que verificaram a presença de anticorpos em 57,10% das amostras analisadas. Quando é realizada a distribuição anual das amostras positivas para anticorpos anti-*T. gondii* IgG, verificamos que em todos os anos a porcentagem foi sempre superior a 50%. Trabalhos anteriores demonstraram uma soroprevalência de anticorpos específicos contra *T. gondii* de 58,9% na região metropolitana de São Paulo¹⁰, indicando que provavelmente não ocorreu variação da soroprevalência nessa região. Dessa forma esse estudo reafirma que a prevalência da toxoplasmose em nosso meio é consideravelmente alta tanto quanto em outras áreas do país, outros autores relataram que entre 50 a 80% das mulheres brasileiras em idade fértil

apresentam anticorpos IgG anti-*T. gondii*¹⁷. Na Índia um recente estudo encontrou soroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* de 45%¹⁸ e em países da Europa central têm-se demonstrado que a taxa de positividade em mulheres na idade fértil por *T. gondii* é de 37 a 58%¹⁹. As possíveis explicações para essas elevadas taxas de prevalência no Brasil e no mundo é provavelmente o contato com fatores de risco como ambientes contaminados por oocistos, proximidade com felinos, inadequado consumo alimentar de carne mal cozida e crua e a falta de costumes adequados de higiene^{20,21,19,22,23}.

Além disso, identificou-se uma relação de aumento da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* nos soros conforme o aumento da idade das pacientes, indicando que a idade é um fator de risco e este já foi demonstrado em vários estudos realizados nos Estados Unidos, Europa, Índia e Américas^{22,24,25,19}.

Neste trabalho 1,95% das amostras apresentaram anticorpos IgM anti-*T. gondii*, demonstrando um importante risco de infecção aguda nas mulheres, o que aumenta as chances da transmissão vertical e conseqüentemente de toxoplasmose congênita. Tem se relatado que a infecção aguda na gravidez varia entre 0,06 a 1,4%, sendo que 15% das infecções intra-uterinas resultam em morte fetal e 80% dos que nascem desenvolvem algum tipo de lesão tardia²⁶. Quando é realizada a correlação de anticorpos IgM com os da classe IgG anti-*T. gondii* verificamos que nas amostras positivas para IgM uma grande parte apresentou altos títulos de anticorpos da classe IgG o que pode caracterizar infecção aguda, enquanto uma parcela possui títulos baixos destes anticorpos o que possivelmente pode caracterizar que a infecção esta se tornando crônica^{27,28,29}.

De acordo com os dados obtidos, acredita-se que o contínuo monitoramento da toxoplasmose através de inquéritos sorológicos é importante para a verificação da taxa de prevalência nas várias regiões do país, havendo a necessidade de desenvolver trabalhos de informação e conscientização das mulheres em idade fértil e da população como um todo para os eventuais problemas de saúde que a toxoplasmose pode gerar. Isso acarretará na identificação da infecção aguda em mulheres gestantes, no seu início, para que seja realizado os cuidados pré-natais, o tratamento correto se necessário, assim evitando lesões ao feto.

REFERÊNCIAS

1. Ravdin, JI. Protozoal Diseases. In: Mandell, GL, Benett, JE, Dolin, R. Principles and Practice of Infectious Disease. v.2, 4ed. Edinburg: Churchill Livingstone; 1995.
2. Dubey, JP. Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other cyst-forming coccidia of humans and animals. In: Kreier JP, editor. Parasitic Protozoa v VI, New York: Academic Press; 1993.
3. Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 1970; 167: 893-6.
4. Dubey JP. Toxoplasmosis - An overview. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1991; 22 (Supl): 88-119.
5. McCannel CA, Holland GN, Helm CJ, Cornell PJ, Winston JV, Rimmer TG. Causes of uveitis in the general practice of ophthalmology. UCLA Community-Based Uveitis Study Group *Am J Ophthalmol* 1996; 121: 35-46.
6. Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 443-57.
7. Maschke M, Dietrich U, Prumbaum M, Kastrup O, Turowski B, Schaefer UW, Diener HC. Opportunistic CNS infection after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1167-76.
8. Remington JS, Mcleod R, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO editors. *Infectious Diseases of the fetus & newborn infant*. 4^{ed}, W.B. Saunders Company, 1995.
9. Sabin AB. Toxoplasmic encephalitis in children. *J Am Med Assoc* 1941; 116: 801-7.
10. Guimarães ACS, Kawarabayashi M, Borges MM, Tolezano JE, Andrade Jr HF. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1993; 35: 479-83
11. Camargo ME, Leser PG. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II Evolutionary study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM-immunofluorescence tests. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1976; 18:227-38.
12. Venkatesan, P, Wakelin, D. Elisias for parasitologists: or lies, damned lies and Elisias. *Parasitol Today* 1993; 9: 228-32.
13. Cavalcante GT, Aguiar DM, Chiebao D, Dubey JP, Ruiz VL, Dias RA, Camargo LM, Labruna MB, Gennari SM. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in human from rural Western Amazon, Brazil. *J Parasitol* 2006; 3: 647-9.
14. Spalding MS, Amendoeira MRR, Klein CH, Ribeiro LC. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(2): 173-7.
15. Coelho RA, Kobayashi M, Carvalho Jr LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003; 45(4): 229-31.
16. Reis MM, Tessaro MM, D'Azevedo PA. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes de um hospital público de Porto Alegre. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2006; 28(3): 158-64.
17. Nóbrega OT, Karnikowski MGO. An estimation of the frequency of gestational toxoplasmosis in the Brazilian Federal District. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(4): 358-60.
18. Singh S, Pandit AJ. Incidence and prevalence of toxoplasmosis in Indian pregnant women: a prospective study. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52: 276-83.

19. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1258-70.
20. Sukthana Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trend Parasitol* 2006; 22(3): 137-43.
21. Petersen E. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 13: 1-10.
22. Bobic B, Jevremovic I, Marinkovic J, Sibalic D, Djurkovic-Djakovic O. Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *Eur J Epidemiol* 1998; 14(6): 605-10.
23. Roghmann MC, Faulkner CT, Lefkowitz A, Patton S, Zimmerman J, Morris JG Jr. Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(5):790-2.
24. Dubey JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 2004; 126: 57-72.
25. Studenièaiová C, Benèaiová G, Holková R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in a healthy population from Slovakia. *Eur J Intern Med* 2006; 17: 470-3.
26. Neto VA, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte SIM. Toxoplasmose. 4ed. Sarvier (SP): Sarvier Publishers;1995.
27. Coutinho SG, Vergara TRC. Toxoplasmose. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias* 1st ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2005. p. 815-32.
28. Moscatelli G, Altcheh J, Biancardi M, Lapena A, Ballering G, Freilij H. Acute toxoplasmosis: clinical and laboratory data in eleven patients. *An Pediatr (Barc)*. 2006; 65(6): 551-5.
29. Cantos GA, Prando MD, Siqueira MV, Teixeira RM. Toxoplasmosis: occurrence of antibodies anti*Toxoplasma gondii* and diagnosis. *Rev Assoc Med Bras* 2000; 46(4): 335-41.