

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS PROVAS DE SABIN-FELDMAN E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-TOXOPLASMA EM SOROS DE CÃES

Masaio Mizuno ISHIZUKA *
Omar MIGUEL *
Dalton França BROGLIATO **

RFMV-A/14

ISHIZUKA, M. M. et al. — *Estudo comparativo entre as provas de Sabin-Feldman e imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-toxoplasma em soros de cães.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 11:127-32, 1974.

RESUMO: As avaliações quantitativas e qualitativas da prova de imunofluorescência indireta para a toxoplasmose canina foram realizadas comparativamente à prova de Sabin-Feldman. Foram examinados 80 soros por ambos os métodos, tendo sido encontrado 94% de concordância entre os resultados qualitativos e, também, uma boa concordância entre os valores de anticorpos, tendo a prova de IFI detectado níveis de anticorpos ligeiramente superiores. Ambas as provas aproximam-se muito quanto à sensibilidade e especificidade e a prova de IFI dispensa o uso de fator acessório e toxoplasma vivo.

UNITERMOS: Toxoplasmose *; Sabin-Feldman (SF)*; Imunofluorescência indireta (IFI)*.

INTRODUÇÃO

A prova de Sabin-Feldman foi durante muito tempo considerada prova padrão para a determinação de anticorpos antitoxoplasma em soros humanos e continua sendo padrão para soros de animais.

Tendo em vista as dificuldades para a sua execução, pelo fato de exigir fator acessório e toxoplasma vivo, justifica-se a preocupação de muitos autores na busca de outras técnicas capazes de determinar quantidades de anticorpos antitoxoplasma no soro.

KELEN et al.⁷ (1962) iniciaram trabalho pioneiro de adaptação de prova de Imunofluorescência indireta (IFI) para a avaliação quantitativa de anticorpos antitoxoplasma em soros humanos.

A este trabalho inicial seguem-se muitos outros como de GARIN et al.⁶ (1963), CAMARGO, M.E.² (1964), STADTSBAE-
DER et al.¹² (1964), FLETCHER, S.⁵ (1965), WALTON et al.¹³ (1966) e CHES-
SUM, B.S.³ (1970). Todos estes autores realizaram trabalhos de comparação entre os resultados de títulos de anticorpos anti-

* Professor Assistente Doutor.

** Técnico de Laboratório.

Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

toxoplasma em soros humanos e são unânimes ao afirmarem da boa concordância entre os resultados de IFI e SF e da maior sensibilidade e praticidade da IFI tornando-a recomendável para rotina de diagnóstico da Toxoplasmose, em substituição a SF.

Relativamente a adaptação da prova de IFI para soros de cães, há apenas o trabalho de MARTIN, Ch.¹⁰ (1972), utilizada no mesmo ano por BRIZARD, A. et al.¹, para avaliar a prevalência de infecção toxoplásmica em cães de Toulouse.

COUTINHO, S.G. et al.⁴ (1968) estimaram a prevalência da infecção toxoplásmica em cães de uma área do Rio de Janeiro pela prova de SF. Da mesma forma, durante um surto de toxoplasmose humana, em Bragança Paulista, MAGALDI et al.⁸ (1967) aventaram a hipótese da possível participação do cão na epidemiologia da doença e realizaram apenas a reação de SF nos soros dos cães envolvidos.

Orientados neste sentido propusemo-nos a realizar um estudo comparativo entre os resultados obtidos pelas provas de IFI e SF em soros de cães (bem como uma avaliação da reprodutibilidade da reação de IFI).

De acordo com a hipótese de nulidade não haveria relação entre os resultados de IFI e SF.

Nossa hipótese de trabalho admitia relação positiva entre IFI e SF.

Fixamos em 0,05 o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Soros

Foram obtidos 80 amostras de soro sanguíneo de cães vindos ao Ambulatório Cli-

nico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

b) Métodos

b₁ — Prova de Sabin-Feldman

Realizada segundo SABIN, A.E. & FELDMAN, H.A.¹¹ (1948).

b₂ — Prova de Imunofluorescência Indireta

Realizada segundo técnica descrita por CAMARGO, M.E.² (1964), exceção feita ao conjugado que era representado por antiglobulina de cão, preparado em coelho, em nosso laboratório.

R E S U L T A D O S

A fim de aquilatarmos da reprodutibilidade da prova de IFI, selecionamos 7 soros com diferentes reatividades diante da prova de SF. Assim, selecionamos soros reagentes a 1:16; 1:64; 1:256; 1:1.000; 1:4.000; e um mantido como testemunho negativo. Cada soro foi dividido em 5 alíquotas e codificadas para permitir leitura cega. Os resultados estão condensados na Tabela I.

Para um primeiro exame do problema, estudamos o comportamento dos soros diante de ambas as provas, tendo os mesmos sido classificados como positivos e negativos.

Considerou-se como positivo soros que diluídos pelo menos a 1:16 determinassem o aparecimento de toxoplasmas fluorescentes pela prova de IFI, 50% ou mais dos toxoplasmas não corados pelo azul de metileno pela prova de SF. Os resultados obtidos figuram na Tabela II.

O coeficiente de associação de Yule, calculado segundo MARASCUILLO⁹ (1971), para os dados constantes da Tabela II, mostrou-se igual a 1, sendo que as provas

ISHIZUKA, M. M. et al. — Estudo comparativo entre as provas de Sabin-Feldman e imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-toxoplasma em soros de cães. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:127-32, 1974.

TABELA I

Títulos de anticorpos anti-toxoplasma em soros de cães medidos pela prova de IFI. São Paulo, 1974.

N.º do soro N.º de replicação	N.º do soro						
	06	01	23	02	08	11	49
1. ^a	—	16	64	256	1000	4000	8000
2. ^a	—	64	16	256	1000	4000	8000
3. ^a	—	16	64	256	1000	4000	8000
4. ^a	—	16	64	256	256	4000	8000
5. ^a	—	64	64	256	1000	4000	8000

TABELA II

Soros de cães, segundo resultados das provas de SF e IFI. São Paulo, 1974.

SF \ IFI	SF		
	+	-	T
+	55	5	60
-	0	20	20
T	55	25	80

apresentaram resultados concordantes em 75 soros (94%) e os restantes 5 soros (6%) foram positivos a IFI e negativos a SF.

O valor de X^2 calculado com base aos dados da Tabela II, foi igual a 66,75 que comparado ao valor crítico de X^2 para um grau de liberdade, foi significativa, ultrapassando de muito o valor crítico de X^2 para o nível de rejeição adotado que é de 3,84.

Para um segundo exame do problema estudamos o comportamento dos títulos de anticorpos (recíprova da diluição) por am-

bas as provas, avaliado pela concordância dos títulos obtidos por ambas as provas, conforme constam na Tabela III.

Observou-se que dentre os resultados positivos por ambos os métodos, 53% dos mesmos foram concordantes, 44% apresentaram 1 diluição de discrepância e 3% em 2 diluições.

Prosseguindo no estudo comparativo dos títulos de anticorpos por ambos os métodos, estudamos a correlação dos títulos obtidos, valendo-nos para tanto, apenas dos dados referentes aos soros positivos, dosados por ambas as provas, conforme consta na Tabela IV.

Para o cálculo desta correlação preferimos empregar método não paramétrico, calculando o coeficiente de correlação de Spearman, segundo MARASCUILLO⁹ (1971), que forneceu valor igual a 0,79, indicando a existência de correlação positiva entre ambos os métodos. Esta correlação mostrou-se significativa ao nível de rejeição adotado de 5%, dando para a estatística "t" de Student o valor igual

ISHIZUKA, M. M. et al. — Estudo comparativo entre as provas de Sabin-Feldman e imuno-fluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-toxoplasma em soros de cães. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:127-32, 1974.

TABELA III

Soros de cães, segundo títulos de anticorpos pelas provas de IFI e SF.
São Paulo, 1974.

IFI \ SF		Títulos de anticorpos							
		—	16	64	256	1000	4000	8000	16000
—	—	20							
16	—	2	7	4					
64	—		5	5	4				
256	—	3	2	3	10	2			
1000	—				4	3	1		
4000	—						3		
8000	—						1	1	
16000	—								0
T	—	25	14	12	18	5	5	1	

TABELA IV

Soros de cães, segundo título de anticorpos anti-toxoplasma medidos pelas provas de IFI e SF. São Paulo, 1974.

SF	IFI	Freq.
16	16	7
16	64	5
16	256	2
64	16	4
64	64	5
64	256	3
256	64	4
256	256	10
256	1000	4
1000	256	2
1000	1000	3
4000	1000	1
4000	4000	3
4000	8000	1
8000	8000	1

a 9,38 sendo que o valor de "t" para o nível de rejeição adotado é igual a 196.

DISCUSSÃO

A utilização da técnica de Imunofluorescência indireta como descrita por CAMARGO, M.E.² (1964), foi facilmente transportada para a espécie canina alterando-se apenas o conjugado que passou a ser uma antiglobulina canina preparada em coelho e conjugada à fluoresceína. Todas as outras etapas da reação foram seguidas na sua totalidade.

A reação de IFI por nós realizada mostrou boa reprodutibilidade não tendo sido observadas diferenças maiores que uma diluição e nem reações falso positivas como consta na Tabela I.

Os resultados apresentados nas Tabelas II e III, demonstraram a existência de uma boa concordância em função tanto dos resultados obtidos (Tabela II), quanto dos resultados dos títulos de anticorpos

(Tabela III). Por outro lado, a técnica de IFI parece ser mais sensível que a SF com base aos 5 soros que foram IFI positivos e SF negativo (Tabela II), e principalmente por terem sido encontrados títulos não muito elevados pois, foram de no máximo igual a 256 (Tabela III).

O estudo da correlação medida pelo coeficiente de correlação de Spearman, com base aos valores constantes na Tabela IV, mostra a existência de uma correlação po-

sitiva significativa entre os resultados obtidos por ambas as provas. Tal correlação foi de elevada intensidade ($R = 0,79$), condição que talvez dependa da natureza idêntica dos anticorpos medidos por uma e por outra prova.

A facilidade de execução da prova de IFI, sua boa reprodutibilidade e a não utilização de fator acessório e toxoplasma vivo, torna a prova recomendável para o uso rotineiro.

RFMV-A/14

ISHIZUKA, M. M. et al. — *Comparisons of the Sabin-Feldman test and indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies to Toxoplasma Gondii in dog serum.* *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. Paulo*, 11:127-32, 1974.

SUMMARY: *The qualitative and quantitative comparison of the Indirect Fluorescent antibody technique for canine toxoplasmosis was made comparing the obtained results with the M.B.D. test results. Eighty serum specimens were examined and the agreement between qualitative results was over 94%, and there was good agreement among antibody titers in quantitative values. The IFI test detected higher titers than M.B.D. test. The sensitivity and specificity of the both techniques appears to be equal.*

UNITERMS: *Toxoplasmosis*; Sabin-Feldman (methylene blue dye test)*; Indirect fluorescent antibody technique*.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRIZARD, A. et al. — Recherche de la fréquence de l'infestation toxoplasmique du chien dans la région toulousaine par la méthode d'immuno-fluorescence indirecte. *Rev. Méd. vet.*, 35(4):447-51, 1972.
2. CAMARGO, M. E. — Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 6:117, 1964.
3. CHESSUM, B. S. — Examination of sera for toxoplasmosis antibody using immunofluorescence. *J. med. Lab. Technol.*, 27:49-54, 1970.
4. COUTINHO, S. G. et al. — Observações sobre a presença de anticorpos para *Toxoplasma gondii*, em cães de área suburbana do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 2(6):285-95, 1968.
5. FLETCHER, S. — Indirect fluorescent antibody technique the serology of *Toxoplasma gondii*. *J. clin. Path.*, 18:193-99, 1965.
6. GARIN, J. P. & AMBROISE-THOMAS, P. — Le diagnostic serologique de la toxoplasmose par la méthode des anticorps fluorescents (Technique indirecte). *Presse med.*, 71(52):2485-88, 1963.

ISHIZUKA, M. M. et al. — Estudo comparativo entre as provas de Sabin-Feldman e imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-toxoplasma em soros de cães. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:127-32, 1974.

7. KELEN, A. E. et al. — Indirect fluorescence antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis. *Canad. J. Microbiol.*, 8:545-54, 1962.
8. MAGALDI, C. et al. — Surto de toxoplasmose em um seminário de Bragança Paulista (Estado de São Paulo). Aspectos clínicos, sorológicos e epidemiológicos. *Rev. Saúde públ. São Paulo*, 1:141-71, 1967.
9. MARASCUILLO, L. A. — *Statistical methods for behavioral science research*. New York. McGraw-Hill, 1971.
10. MARTIN, Ch. — Recherche de l'infection toxoplasmique du chien par méthode de l'immunofluorescence. Toulouse, 1972. [These].
11. SABIN, A. B. et FELDMAN, H. A. — Dyes as microchemical indicators of a new. Immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (Toxoplasma). *Science*, 108:660, 1948.
12. STADTSBAEDER, S. et al. — Diagnostic serologique de la toxoplasmose par l'immunofluorescence. *Acta clin. belg.*, 19:161-66, 1964.
13. WALTON, B. C. et al. — Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 16(2):149-52, 1966.

Recebido para publicação em 28-8-74
Aprovado para publicação em 29-8-74