

POTENCIAL DAS IMUNOGLOBULINAS IgG2 E IgG4 NO IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOCARÍASE HUMANA UTILIZANDO ANTÍGENOS TES-30 E TES-120 RECOMBINANTES

**GIULI ARGOU MARQUES¹; MORGANA LÜDTKE AZEVEDO²; LUCAS MOREIRA
DOS SANTOS²; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO³**

¹Universidade Federal de Pelotas – giulizynhah@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lucass1@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - morganaludtke@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Toxocaríase é uma zoonose causada pela família de nemátodos Toxocaridae. Somente as espécies *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, que tem como hospedeiro definitivo cães e gatos, respectivamente, são reconhecidas por causar infecção em humanos (FILLAUXA, 2013), que ocorre principalmente pela ingestão de ovos embrionados presentes em solo contaminado ou pela ingestão de carne crua de pequenos animais infectados, como coelhos (CDC, 2017).

Embora muitas das infecções em humanos sejam assintomáticas, os ovos eclodem e suas formas larvais, que não conseguem se tornar adultas, começam a se disseminar pelos tecidos por meio da corrente sanguínea por meses ou, até mesmo, anos causando danos (DESPOMMIER, 2003).

Essa migração tecidual leva a síndrome conhecida como Larva Migrans Visceral (LMV), caracterizada por febre, tosse, sibilo, indisposição, perda de peso e aumento do fígado e do baço (PINELLI, 2013), ou como a Toxocaríase Ocular, podendo causar danos oculares irreversíveis, como granulomas de periferia e do polo posterior (SEONG, 2014; MORAIS, 2012).

O diagnóstico para LMV é predominantemente laboratorial, devido à sintomatologia branda para diagnóstico clínico, sendo o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), o padrão-ouro para diagnóstico da infecção utilizando抗ígenos secretados pelas larvas (SAVIGNY, 1975).

O uso de抗ígenos recombinantes oferece benefícios significantes para detecção de anticorpos anti-*Toxocara* spp. porque sua produção é rápida, simples e não exige o cultivo de larvas *in vitro*. Na literatura, ensaios utilizando抗ígenos recombinantes aumentaram a sensibilidade e especificidade comparados com ensaios utilizando抗ígenos TES nativo (MOHAMAD, 2009).

Há quatro subclasses de imunoglobulina G (IgG) humana (IgG 1-4) que são caracterizadas por diferenças antigenicas nas suas cadeias pesadas. IgG 1-4 constituem aproximadamente 61, 30, 5 e 4% da IgG total, respectivamente. Cada subclassa de IgG tem diferenças biológicas e propriedades físico-químicas e por isso são preferencialmente produzidos em resposta a diferentes抗ígenos e condições patológicas. Alguns investigadores analisaram o valor potencial de subclasses específicas de anticorpos IgG no diagnóstico de diversas infecções por helmintos. Em estudos com o diagnóstico da toxocaríase humana uma ambiguidade quanto a qual a subclassa mais específica pode ser vista, dado que em ensaios realizados por Watthanakulpanich, foi observado que a IgG2 é a imunoglobulina mais sensível na detecção dos抗ígenos, enquanto nos ensaios realizados por Mohamad, foi a IgG4 (WATTHANAKULPANICH, 2008; MOHAMAD, 2009).

O presente trabalho visou analisar o potencial da IgG2 e IgG4 em contraponto à IgG total no diagnóstico de toxocariase humana, utilizando antígenos TES-30 e TES-120 recombinantes.

2. METODOLOGIA

Plasmídeos contendo genes para as proteínas recombinantes de *Toxocara canis* (rTES-30 e rTES-120) foram utilizados para transformar *Escherichia coli* BL21 Star, por choque térmico. Em seguida, as cepas recombinantes foram cultivadas a 37º C em 50 mL de meio LB contendo 100 µg/mL ampicilina, sob agitação a 180 rpm, durante 16 horas. Posteriormente, o volume foi transferido para 500 mL de meio LB contendo ampicilina, sob as mesmas condições de temperatura e agitação. Após o cultivo atingir a D.O. 600 nm de 0,6, medida em espectrofotômetro, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG 0,5 mM e incubação sob agitação por 3 horas a 37ºC. Em seguida, realizou-se a lise celular, com lisozima e sonicação, seguida de centrifugação e solubilização em 50 mL de tampão com uréia 6 M. As proteínas foram purificadas em cromatografia de afinidade com Níquel (Ni⁺²), utilizando colunas de gravidade His GraviTrap (GE Healthcare). Verificou-se a expressão dos抗ígenos recombinantes em eletroforese em gel SDS-PAGE, confirmação por Western blotting, quantificação por curva de BSA em gel SDS-PAGE.

As proteínas recombinantes foram utilizadas em um ELISA indireto. A placa de 96 cavidades foi sensibilizada com a proteína recombinante diluída em tampão carbonato/bicarbonato na concentração de 50 ng por cavidade e incubada à 4°C overnight. Após, a placa é lavada com PBS-T para remoção do excesso de proteína e realizada a etapa de bloqueio, com leite em pó a 10%, sendo incubada a 37°C por 1h. Posteriormente, a placa foi novamente lavada com PBS-T para remoção do excesso de solução de bloqueio, e foram adicionados os soros humanos diluídos em PBS-T na concentração 1:150, 5 positivos e 5 negativos para toxocariase, e novamente incubado a 37°C por 1h. Depois desta etapa, é realizado novamente as etapas de lavagens e adicionados os anticorpos conjugados a peroxidase (anti-IgG Total, anti-IgG2 e anti-IgG4) nas concentrações 1:2500 (IgG4 e IgG2) e 1:5000 (IgG Total), de acordo com a padronização previamente realizada. Os conjugados são incubados a 37°C por 1 h, e após esse período, é realizado a revelação por Orto-Feníleno-Diamina (OPD) com tempo de incubação de 15 minutos a temperatura ambiente. O resultado foi analisado em uma leitora de placas em 450 nm. Os dados foram tabulados em Excel e analisados com o software GraphPad.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo os resultados demonstrados na tabela 1, observa-se que não houve diferença de sensibilidade, entre os conjugados, na proteína recombinante TES-120. Já na proteína TES-30, pode-se observar que o conjugado IgG4 apresentou a maior sensibilidade, seguido do conjugado IgG total e, por fim, IgG2. Tais resultados corroboram os achados do estudo de Mohamad, diferindo dos resultados apresentados por Watthanakulpanich (WATTHANAKULPANICH, 2008; MOHAMAD, 2009).

Tabela 1: Sensibilidade e especificidade da rTES-30 e rTES-120 no diagnóstico para Toxocaríase Humana utilizando os conjugados IgG Total, IgG2 e IgG4.

	rTES-30 IgG Total	rTES-30 IgG2	rTES-30 IgG4	rTES-120 IgG Total	rTES-120 IgG2	rTES-120 IgG4
Sensibilidade	80%	75%	100%	100%	100%	100%
Especificidade	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Cut-off ¹	0,68	0,07	0,14	0,68	0,08	0,34

¹ Cut-off calculado pela média dos negativos mais dois desvios-padrões.

As altas especificidades demonstradas pelos nossos resultados ocorrem devido ao uso de proteínas recombinantes específicas do parasita *T. canis*, estratégia que realça a importância do uso dessa tecnologia no diagnóstico dessa doença, pois o diagnóstico padrão, atualmente utilizado, apresenta uma alta reatividade cruzada com parasitas com epidemiologias e sintomatologias semelhantes (MOREIRA, 2014). Esta reatividade cruzada acaba por gerar resultados falso-positivos, por que os anticorpos de outras infecções, como toxoplasmose, teníase ou ascariídase, reconhecem o antígeno TES como descrito por Jacquier (1991), Ishida (2003), Mohamad e Roldán (2009), Jin (2015) e Rudzińska (2017).

Outro ponto importante para o diagnóstico seria a análise pelo cut-off (limiar do diagnóstico) nos diferentes conjugados. Nossos resultados apresentam valores de cut-off elevados para IgG Total, o que poderia ser um contraponto na sua utilização se aumentado o número de amostras utilizadas. Já os valores de IgG2 foram os menores, contudo a baixa de sensibilidade na proteína rTES-30 não pode ser descartada. Por fim, a IgG4 apresentou valores de cut-off medianos e, por sua alta sensibilidade destacou esse conjugado em todas as análises.

A principal limitação dessa análise foi o baixo número de amostras. Contudo, esse estudo trata-se de um piloto para ser realizado em um maior número de amostras. Não obstante, todos os resultados foram repetidos pelo menos duas vezes e, em teoria, servem como base e podem ser extrapolados ao aumentarmos o número de amostras.

4. CONCLUSÕES

Foi possível concluir com este estudo que a aplicação de protocolos de diagnóstico para toxocaríase humana com IgG4 apresenta maior sensibilidade que protocolos com utilizando IgG total ou com IgG2, ao ser utilizado antígenos recombinantes TES-30 e TES-120 de *Toxocara canis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FILLAUXA, J.; MAGNAVAL, F. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. **Veterinary Parasitology**, volume 193, 4^a edição, pág. 327-336, abril de 2013.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Parasites-Toxocariasis - Biology**. Acessado em 01 de outubro de 2017. Online. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/biology.html>.
- DESPOMMIER, D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, volume 16, 2^a edição, pág. 265-272, abril de 2003.
- PINELLI, E.; ROELFSEMA, J. H.; BRANDES S.; KORTBEEK T. Detection and identification of *Toxocara canis* DNA in bronchoalveolar lavage of infected mice

using a novel real-time PCR. **Veterinary Parasitology**, volume 193, 4^a edição, pág. 337-341, abril de 2013.

SEONG, J. A.; NA-KYUNG, R.; SE, J. W. Ocular toxocariasis: clinical features, diagnosis, treatment, and prevention. **Asia Pacific Allergy**, volume 4, 3^a edição, pág. 134-141, julho de 2014.

MORAIS, F. B.; et al. Achados ultrassonográficos em toxocariase ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, volume 75, 1^a edição, pág. 43-47, 2012.

SAVIGNY, D.H.; In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans; **J. Parasitol.** 61, 781-782, 1975.

MOHAMAD, S.; AZMI, N. C.; NOORDIN, R. Development and Evaluation of a Sensitive and Specific Assay for Diagnosis of Human Toxocariasis by Use of Three Recombinant Antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 47, n.6, 1712-1717, 2009.

WATTHANAKULPANICH, D.; SMITH, H. V.; HOBBS, G.; WHALLEY, A. J.; BILLINGTON, D. Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. **Acta tropica**. 106, 90-95, 2008.

MOREIRA, G. M. S. G.; et al. Human Toxicariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. **Trends in Parasitology**, v30, n9, p456-464, set 2014.

JACQUIER, P.; GOTTSSTEIN, B.; STINGELIN, Y.; ECKERT, J. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 29, n.9, p1831-1835, 1991.

ISHIDA, M. M. I.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, A.W.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; VAZ, A. J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. **Acta Tropica**, v89, n1, p73-84, 2003.

ROLDÁN, W. H.; ESPINOZA, Y. A.; HUAPAYA, P. E.; HUIZA, A. F.; SEVILLA, C. R.; JIMÉNEZ, S. Frequency of human toxocariasis in a rural population from Cajamarca, Peru determined by DOT-ELISA test. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** vol.51, no.2, 2009.

JIN, Y.; SHEN, C.; HUH, S.; CHOI, M. H.; HONG, S. T. Cross-reactivity of Toxocariasis with Crude Antigen of *Toxascaris leonina* Larvae by ELISA. **J Korean Med Sci**, v30, n5, p549-551, 2015.

RUDZIŃSKA, M.; KOWALEWSKA, K.; SIKORSKA, K. Clinical usefulness of Western blotting and ELISA avidity for the diagnosis of human toxocariasis. **Parasite Imunology**, v39, n1, p1-6, 2017.