

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ISOLINA MARIA XAVIER RODRIGUES

DIAGNÓSTICO PÓS-NATAL DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA  
ATRAVÉS DA DETECÇÃO DE ANTICORPOS DAS CLASSES IgG,  
IgM E IgA ANTI-*Toxoplasma gondii*

**Orientadora:**

Dra. Mariza Martins Avelino

**Co-orientadora:**

Dra. Ana Maria de Castro

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Goiânia-GO, 2006.

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA TROPICAL

**ISOLINA MARIA XAVIER RODRIGUES**

**DIAGNÓSTICO PÓS-NATAL DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA  
ATRAVÉS DA DETECÇÃO DE ANTICORPOS DAS CLASSES IgG,  
IgM E IgA ANTI-*Toxoplasma gondii***

**Orientadora:**

Dra. Mariza Martins Avelino

**Co-orientadora:**

Dra. Ana Maria de Castro

Dissertação submetida ao PPGMT/UFG como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre, na área de concentração de Parasitologia.

Esse trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia/SUS.

**Goiânia - GO, 2006.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(GPT/BC/UFG)

Rodrigues, Isolina Maria Xavier.

**R696d Diagnóstico pós-natal da toxoplasmose congênita através da detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii* / Isolina Maria Xavier Rodrigues. - Goiânia, 2006.**

x, 114 f.

Orientadora: Mariza Martins Avelino e Co-Orientadora: Ana Maria de Castro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2006.

#### Bibliografia

1. Toxoplasmose – Recém nascido 2. Toxoplasmose – Diagnóstico 3. Anti-*Toxoplasma gondii* 4. Toxoplasmose – Transmissão I. Avelino, Mariza Martins II. Castro, Ana Maria se III. Universidade Federal de Goiás. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública II. Título.

CDU: 616.99-053.31

## DEDICATÓRIA

“À minha mãe, meu pai (in memoriam), meu filho e meu marido.

Amo-os tanto, de uma forma tão tremenda

e desmedida que, mesmo ao longo de

minha vida, não terei tempo bastante para

tanto vos amar”.

## AGRADECIMENTOS

A solidão que sempre acompanha um trabalho de dissertação foi povoada pela solidariedade e alegria trazidas por amigos e parentes. Cada um à sua maneira deu o suporte, sem o qual esse trabalho dificilmente aconteceria.

À Professora Doutora Mariza Martins Avelino, por ter me aceito como sua orientanda. Obrigada por ter me conduzido com imensa tranquilidade e sabedoria e por ter me aberto as portas para a pesquisa, com discussões instigantes e convívio amigo.

À Professora Doutora Ana Maria de Castro, pelo acompanhamento e contribuição fundamental, desde antes e ao longo de toda a pesquisa.

Aos professores do Programa de Mestrado em Parasitologia, pelas excelentes aulas ministradas e pela experiência compartilhada.

Aos funcionários da secretaria do mestrado, Zezinho e Karine, pelo excelente trabalho prestado, sempre com muita dedicação e paciência.

Aos funcionários da Maternidade do Hospital das Clínicas, em especial os técnicos de enfermagem que me auxiliaram na coleta do sangue dos recém-nascidos.

À minha grande amiga e chefe Maria Heloisa Mesquita, pelo grande apoio e estímulo. Sem a sua ajuda esse trabalho não haveria tido início e muito menos fim.

À Kátia Braga Amorim e Priscila Wolski Lucas, que me auxiliaram na realização de todos os exames e na organização do arquivo dos dados e amostras biológicas. Sem a ajuda de vocês esse trabalho não teria sido realizado.

Às minhas chefes do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas, Vera Lúcia Brandão e Nancy Helena, pela compreensão que tiveram comigo, principalmente durante a realização das disciplinas.

Ao Eduardo e Carlos Heitor, por terem realizado a coleta de sangue periférico dos recém-nascidos da Maternidade. Sem seu precioso trabalho os exames não poderiam ter sido realizados.

À Profª Joana D´arc do Laboratório Rômulo Rocha, que possibilitou que os exames fossem enviados ao Laboratório Atalaia para serem realizados.

À Antonela e Eliane, funcionárias do Laboratório do IPTSP, que muito me ajudaram, antes e durante a realização dessa pesquisa.

À toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas, recepcionistas, auxiliares e técnicos de laboratório, digitadores, biomédicos, que de alguma forma me auxiliaram na realização desta pesquisa.

Aos meus cunhados, Jaques Gonçalves Filho, Divina Gonçalves Rodrigues, Lourdes Gonçalves Rodrigues e Divino Pereira Marques, e sobrinhos Leonardo Michel R. Ferreira e Ellen Cruvinel, que me ajudaram na digitação da minha dissertação e de todos os trabalhos realizados durante o mestrado.

À minha mãe, por ter estado ao meu lado inclusive morando comigo durante os dois anos de realização deste estudo. Jamais poderei retribuir o seu amor e compreensão.

Ao meu filho, Ian, razão da minha vida, que mesmo sendo criança, soube compreender a minha ausência e dar-me força e tranquilidade nos momentos difíceis.

Ao meu marido, pelo grande estímulo que me deu para que voltasse a estudar e a acreditar em mim mesma.

À minha amiga Zilma Dourado, pela ajuda e estímulo durante a realização das disciplinas e pelo apoio emocional durante estes dois anos. Espero que nossa amizade continue firme e sincera.

Às minhas amigas do Departamento de Controle e Avaliação, Rose, Janete, Cidinha e Adriana, pelo apoio e proteção.

Às mães, que permitiram a inclusão de seus filhos neste estudo. Minha eterna gratidão e que Deus abençoe vocês e seus filhos.



**LISTA DE TABELAS**

TABELA I - Perfil sorológico dos anticorpos das classes IgM e IgA Anti-*Toxoplasma gondii* em recém-nascidos com Toxoplasmose Congênita da Maternidade do Hospital das Clínicas de Goiânia (GO), Brasil, 2005----- 73

TABELA II - Determinação da Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Negativo e Acurácia das reações sorológicas utilizadas no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, Goiânia (GO), Brasil, 2005-----74

## LISTA DE ABREVIATURAS

APAE – Associação de Pais e Amigos de Excepcionais.

ELFA – Enzyme Linked Fluorescent Assay

ELISA – Enzyme Linked Immunoassay.

HC – Hospital das Clínicas.

IFI – Imunofluorescência Indireta.

ISAGA - Aglutinação por Imunoabsorção.

LCR – Líquido cefalorraquidiano.

MEIA - Microparticle Enzyme Immunoassay.

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.

RN – recém-nascido (s).

SUS – Sistema Único de Saúde.

## SUMÁRIO

<b>I</b>	<b>APRESENTAÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	01
<b>II</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	08
1.	Histórico.....	09
2.	Etiologia.....	11
3.	Ciclo Biológico.....	13
4.	Mecanismos de Transmissão.....	18
5.	Perfis e Marcadores Sorológicos da Toxoplasmose.....	20
6.	Diagnóstico da Toxoplasmose.....	22
6.1.	Diagnóstico Clínico.....	22
6.2.	Diagnóstico Laboratorial.....	26
6.2.1	Diagnóstico Parasitológico da Toxoplasmose.....	27
6.2.2.	Diagnóstico Sorológico da Toxoplasmose.....	29
6.2.3.	Diagnóstico da Toxoplasmose na Gestante e no Feto.....	36
6.2.4.	Diagnóstico da Toxoplasmose no Recém-Nascido.....	39
7.	Tratamento.....	41
7.1	Gestante com Toxoplasmose Aguda.....	41
7.2.	Criança com Toxoplasmose Congênita.....	42
8.	Epidemiologia da Toxoplasmose.....	45
9.	Profilaxia.....	47
<b>III</b>	<b>ARTIGO 1</b> .....	51
1.	Introdução.....	52
2.	Material e Métodos.....	55
3.	Resultados.....	57

4.	Discussão.....	59
5.	Referências Bibliográficas.....	61
<b>IV</b>	<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>63</b>
1.	Introdução.....	65
2.	Material e Métodos.....	67
3.	Resultados .....	71
4.	Discussão .....	74
5.	Referências Bibliográficas .....	77
<b>V</b>	<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>79</b>
<b>VI</b>	<b>RESUMO .....</b>	<b>82</b>
<b>VII</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>85</b>
<b>VIII</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>88</b>
<b>IX</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>100</b>

**I - APRESENTAÇÃO, JUSTIFICATIVA E  
OBJETIVOS**

## 1. APRESENTAÇÃO

Essa dissertação aborda o diagnóstico sorológico precoce da toxoplasmose congênita em recém-nascidos da Maternidade do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, referência para o controle da toxoplasmose congênita no município de Goiânia e estado de Goiás. É composta por dois trabalhos, realizados de forma complementares, apresentados em dois artigos.

No primeiro artigo, os resultados obtidos da quantificação sorológica de anticorpos das classes IgG e IgM anti-toxoplasma pela técnica MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) no sangue do cordão umbilical de 1514 recém-nascidos (RN) permitiu selecionar 86 RN suspeitos de infecção congênita pelo *T. gondii*. Realizou-se a coleta do sangue periférico desses suspeitos e de 81 RN normais para verificar se havia diferença significativa entre os resultados obtidos com o sangue do cordão umbilical e o sangue periférico. Essa comparação teve a finalidade de analisar se os resultados do sangue de cordão poderiam ser usados, de forma segura, na triagem dos RN suspeitos de toxoplasmose congênita, isso porque as técnicas automatizadas exigem uma quantidade significativa de soro e a coleta do sangue periférico dos RN seria inviável em função da sua baixa volemia dos mesmos. As amostras dos suspeitos foram testadas pela técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) para detecção de IgM por imunocaptura, possibilitando o diagnóstico da toxoplasmose congênita e a confirmação dos resultados obtidos pela técnica MEIA.

No segundo artigo, analisamos os resultados da sorologia para detecção de IgM por IFI e IgA por ELISA captura nas amostras dos 56 RN que retornaram para acompanhamento no Ambulatório de Infecções Congênicas do HC e que já haviam

realizado sorologia por MEIA e ELFA. Com base em critérios clínicos e laboratoriais o médico responsável pelo acompanhamento dessas crianças concluiu o diagnóstico da presença ou ausência de toxoplasmose congênita em 44 crianças, sendo que 28 estavam infectadas e 16 não estavam. Com a confirmação do diagnóstico foi possível determinar a sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos positivo e negativo das quatro técnicas sorológicas usadas no diagnóstico da toxoplasmose congênita. Os resultados obtidos nos dois trabalhos mostraram que os anticorpos da classe IgA e IgM anti-toxoplasma, quando negativos, não podem ser considerados como marcadores seguros da ausência de toxoplasmose congênita, sendo necessário o acompanhamento dos suspeitos com a realização de vários exames complementares que permitam concluir o diagnóstico dessa doença o mais rapidamente possível, uma vez que as crianças suspeitas são medicadas até que se possa afastar a possibilidade da transmissão vertical, a fim de que não sofram as conseqüências das inúmeras seqüelas que essa doença pode causar.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os anticorpos das classes IgM e IgA anti *T. gondii*, quando presentes no soro de crianças com suspeita de infecção congênita, permitem o diagnóstico definitivo de transmissão vertical. Porém muitas crianças congenitamente infectadas não apresentam estes anticorpos, dificultando o diagnóstico.

A técnica mais usada para detecção dos anticorpos da classe IgM é a Imunofluorescência Indireta. Esta técnica apresenta baixa sensibilidade, quando usada em recém-nascidos, pois é capaz de detectar IgM em apenas 25% dos congenitamente infectados (Wong & Remington 1994). Acredita-se que a elevada falsa-negatividade da IgM (75%) por esta técnica ocorra em função da presença de IgG materna em altas concentrações, que satura os receptores antigênicos, impedindo que os anticorpos da classe IgM se liguem ao antígeno, sendo eliminados durante o processo de lavagem da reação. Resultados falsamente positivos também podem ocorrer quando o soro contém fator reumatóide (Stray-Pedersen 1993), diminuindo consideravelmente a especificidade deste teste.

A pesquisa de anticorpos IgA anti-toxoplasma tem sido recomendada para diagnóstico da infecção neonatal, tanto ou até mais sensível que a de anticorpos IgM (Stepick-Biek et al. 1990), porém é pouco usada devido ao custo elevado e as dificuldades de padronização da técnica. Atualmente as técnicas mais usadas são a ELISA captura e a ISAGA, sendo a última pouco usada no Brasil.

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose, para detecção de anticorpos das classes IgM e IgG, foi modificado nos últimos anos pela necessidade de automatização



dos testes, devido ao grande número de amostras analisadas em laboratórios e pela introdução de ensaios com maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Vários sistemas totalmente automatizados foram desenvolvidos, minimizando interferências nos resultados que podem ocorrer durante o preparo do reagente, na pipetagem de amostras e reagentes, nas lavagens e na leitura que, no caso da imunofluorescência, é subjetiva. Porém, ainda não foram desenvolvidos sistemas automatizados seguros para detecção dos anticorpos da classe IgA anti-toxoplasma.

Das técnicas sorológicas realizadas em equipamentos automatizados, as mais usadas são a MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) no sistema AXSYM desenvolvido pela Abbott (USA) e ELFA (Enzyme Fluorescent Assay) no sistema VIDAS da Bio-Merieux (França). A técnica ELFA é mais sensível e específica que a Imunofluorescência Indireta, podendo diagnosticar, pelo achado da IgM, 80 a 90 % das crianças com toxoplasmose congênita (Camargo 2001). A técnica MEIA não foi testada em recém-nascidos, por isso a sua sensibilidade e especificidade não são conhecidas nesta população (Manual Abbott, 2000).

Inúmeras dificuldades são encontradas pelo clínico em fazer o diagnóstico da toxoplasmose congênita, pois cerca de 80 % dos recém-nascidos são assintomáticos ao nascer, podendo permanecer durante anos sem nenhuma manifestação da doença (Caiaffa et al. 1993). A necessidade de se encontrar métodos sorológicos que sejam mais sensíveis e específicos que a Imunofluorescência Indireta no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, motivaram a realização desse estudo.

A IgM, quando detectada por métodos automatizados, pode permanecer reagente por mais de dois anos em alguns pacientes, demonstrando a alta sensibilidade desses métodos na detecção desse anticorpo. Nas gestantes, esta alta sensibilidade dificulta o diagnóstico da infecção aguda, sendo necessário realizar o teste de avidéz da

IgG para diferenciar infecção recente de infecção passada. Em recém-nascidos, esta alta sensibilidade é vantajosa, pois a presença de IgM anti *T. gondii*, associada à sorologia da mãe, é suficiente para concluir o diagnóstico da infecção congênita.

Espera-se que a detecção de anticorpos da classe IgM anti-toxoplasma usando técnicas automatizadas (MEIA e ELFA) e a detecção da IgA por ELISA captura possam ser ferramentas eficazes no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, para que um tratamento seguro possa ser instituído visando a prevenir as inúmeras seqüelas que podem ocorrer, uma vez que os métodos de identificação do *T. gondii* por cultura e/ou Reação em Cadeia da Polimerase são exames de custo elevado, de difícil execução e que necessitam de laboratórios de alta complexidade para serem realizados.

### 3. OBJETIVOS

1. Analisar se há diferença significativa entre as concentrações dos anticorpos das classes IgG e IgM anti-toxoplasma em amostras do sangue do cordão umbilical e do sangue periférico de recém- nascidos, através da técnica MEIA.

2. Verificar a prevalência de anticorpos da classe IgG e IgM anti-*T. gondii* no sangue do cordão umbilical dos recém-nascidos da Maternidade do Hospital das Clínicas.

3. Determinar a especificidade, sensibilidade, acurácia, valores preditivos positivo e negativo das técnicas MEIA-IgM, ELFA-IgM, IFI-IgM e ELISA-IgA no diagnóstico da toxoplasmose congênita, no período neonatal precoce.

## **II – REVISÃO DA LITERATURA**

## 1. HISTÓRICO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intestinal de felinos com uma grande variedade de hospedeiros intermediários, animais de sangue quente, incluindo o homem. O nome toxoplasma (toxon = arco, plasma = forma) é derivado da forma em crescente (taquizoíta) mais comumente observada.

O parasita foi isolado em 1908, quase ao mesmo tempo e independentemente por Afonso Splendore, no Brasil, em um coelho que morreu com paralisia, e por Nicolle M. M. C. & Manceaux L. em células mononucleares do baço e fígado de um roedor africano, (*Ctenodactylus gundi*), no Instituto Pasteur da Tunísia (norte da África). Provavelmente a infecção por *T. gondii* nesses animais foi adquirida em laboratório, o que foi demonstrado no *C. gundi* por Chatton & Blanc (1917). Como o roedor de onde foi isolado o *T. gondii* era habitualmente utilizado como modelo experimental de leishmaniose, houve desde então a proposição de que o mesmo deveria ser transmitido por vetores artrópodes, mas outros autores, em pesquisas mais recentes, não conseguiram demonstrar este tipo de transmissão (Frenkel, 1975).

A doença foi considerada apenas uma zoonose até 1923, quando Janku J., em Praga, relatou o caso de uma criança falecida com 11 meses de idade. Ela apresentava hidrocefalia e cegueira e, na necropsia, em cortes do globo ocular direito, ficaram evidenciados parasitas semelhantes ao *T. gondii*. Segundo esse autor, tratava-se de infecção de origem congênita.

Em 1926 Margarino Torres, no Rio de Janeiro, descreveu a presença de microrganismos, que identificou como *Toxoplasma* ou *Encephalitozoon*, em cortes

histológicos de cérebro, miocárdio e músculos esqueléticos de um recém-nascido falecido com 29 dias de vida. Houve, também, menção à possibilidade de corresponder essa comprovação a uma afecção congênita.

Wolf & Cohen (1937) foram os primeiros autores a descrever a infecção congênita no homem relatando a ocorrência de toxoplasmose fatal em recém-nascido com encefalite, meningite e mielite, embora com alguns erros de classificação que foram posteriormente corrigidos. Depois, Wolf e cols., em 1939, comunicaram a existência do *T. gondii* em lesão do sistema nervoso central de criança falecida com um mês de vida.

Pinkerton & Weinman (1940) e Pinkerton & Hendersonmas (1942), nos Estados Unidos, registraram a ocorrência de toxoplasmose em adultos, com isolamento do parasita, mas somente após o desenvolvimento de um teste sorológico, o clássico teste do corante (dye test) de Sabin & Feldman (1948), é que foi possível identificar a frequência real desta infecção humana, muito maior do que até então imaginada, representando importante contribuição para o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose e possibilitando, paralelamente, a realização de inquéritos epidemiológicos. A seguir, houve preconização de várias outras reações, das quais merecem especial destaque, por serem mais frequentemente empregadas, as de hemaglutinação (Jacobs & Lunde, 1957) e de imunofluorescência indireta (Kelen e cols., 1962), valendo a pena citar, ainda, a de fixação de complemento (Nicolau & Ravelo, 1937; Waren & Sabin, 1942). Frenkel (1948) inseriu no contexto de provas para reconhecimento da parasitose, o teste da sensibilidade cutânea a toxoplasmina.

Finalmente, Frenkel e cols. e Sheffield & Melton (1969) dissociaram a transmissão da toxoplasmose do sistema de helminto, sendo que o oocisto, forma encontrada nas fezes do gato, foi caracterizado por Dubey e cols. (1970), inclusive com

elucidação da fase sexuada do agente. Miller e cols. (1972) provaram que os únicos mamíferos que suportam o ciclo sexuada intestinal do *T. gondii* e excretam oocistos são os felinos, tanto domésticos como selvagens.

A partir de 1981, com o aparecimento da Síndrome de Imunodeficiência adquirida (SIDA), a toxoplasmose teve a sua importância aumentada em virtude da possibilidade da reagudização, que pode acontecer nos indivíduos cronicamente infectados pelo protozoário, e da gravidade da forma reagudizada nesses pacientes, tornando-se uma importante causa de morbidade e morte (Israelki & Remington 1988).

Nas últimas décadas, extraordinários avanços foram conseguidos, como a descrição de diversos métodos sorológicos. Além disso, conquistas recentes na imunologia e na biologia molecular e celular têm permitido um melhor diagnóstico da parasitose, bem como novos progressos na assistência de grávidas, crianças e indivíduos imunocomprometidos.

## **2. ETIOLOGIA**

O *T. gondii* é um protozoário do filo Apicomplexa, pertencente à família *Sarcocystidae*, da classe *Sporozoa*, subclasse *Coccidia*, subordem *Eimereina*. Possui três formas evolutivas ao longo de seu ciclo evolutivo: taquizoítos, bradizoítos e oocistos (Hinrichsen 2005).

O taquizoíto é a forma encontrada durante a fase aguda da infecção, sendo também denominada forma proliferativa, forma livre ou trofozoíto. Foi a primeira forma descrita e o seu aspecto morfológico, em forma de arco (toxon = arco), deu o nome ao gênero. Essa forma requer um habitat intracelular para se multiplicar e sobreviver, sendo rapidamente destruída no suco gástrico (Jacobs et al. 1960). Sua reprodução

dentro das células do hospedeiro ocorre por endodiogenia, um processo de brotamento interno em que duas células-filha são formadas dentro da célula-mãe, sendo então liberadas após ruptura. A forma de taquizoíto é encontrada no estágio agudo da infecção, invadindo todos os tipos de células. Após a invasão das células do hospedeiro, os microrganismos se multiplicam rapidamente nos seus vacúolos, formando rosetas. O citoplasma torna-se repleto de taquizoítos a ponto de se romper e provocar a liberação destes, que invadem células contíguas ou são fagocitados (Amato & Marchi 2002).

A forma de resistência do *T. gondii* nos tecidos é o cisto contendo bradizoítos, que pode permanecer viável pelo resto da vida do hospedeiro (Dubey & Frenkel 1976). Os bradizoítos podem estar presentes em todos os tecidos, porém, os principais sítios de infecção latente ocorrem no miocárdio, cérebro e tecido músculo-esquelético (Remington & Cavanaugh 1965). A parede do cisto pode ser rompida por causa da pepsina ou da tripsina, sendo que os bradizoítos liberados permanecem viáveis por até duas horas em meio contendo ácido clorídrico e pepsina, ou até seis horas, em meio contendo tripsina, permitindo sobreviverem ao período de digestão normal do estômago e no duodeno. O congelamento abaixo de 20°C negativos e o aquecimento acima de 66°C destroem a forma cística do parasita, entretanto em temperatura de 4°C, este pode sobreviver por até dois meses (Jacobs et al. 1960). Um aspecto importante do cisto é uma possível reativação da infecção, causada pela liberação de bradizoítos, que se transformam em taquizoítos e promovem uma nova infecção aguda local (Frenkel et al. 1975). Em 1985, Hofflin & Remington observaram que a reativação também pode ocorrer à distância, como na presença de múltiplas lesões de encefalite em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

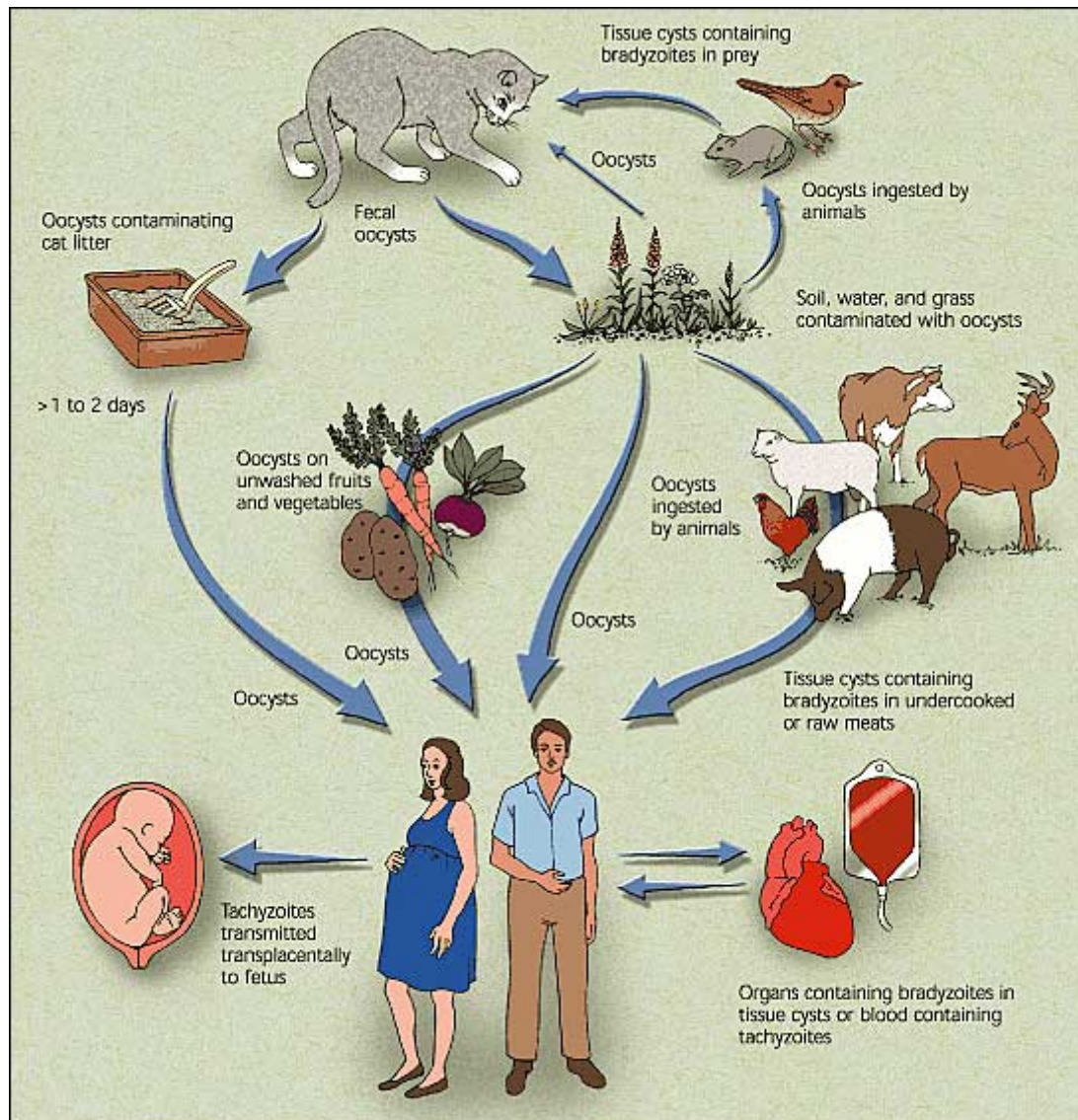
Os oocistos são produzidos nas células intestinais de felídeos não imunes e são eliminados imaturos junto com as fezes. Em condições adequadas de umidade e



temperatura, o oocisto sofre esporulação formando dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos. Após uma infecção aguda no gato, os oocistos são liberados em grandes quantidades pelas fezes, chegando a bilhões por dia. Essa eliminação maciça de oocistos é máxima entre cinco e dez dias após a infecção inicial e dura apenas algumas semanas. O oocisto, após sua maturação, é viável por muitos meses e até anos no solo, desde que em condições razoáveis de umidade relativa, sendo extremamente resistentes a esterilizantes químicos (por exemplo, resistem por uma hora à tintura de iodo a 2%, solução sulfocrômica, ácido hipocloroso a 10%). Nas variadas condições ambientais testadas por Frenkel e cols. (1975), os oocistos permaneceram viáveis por pelo menos um ano, mantidos no próprio material fecal, resistindo a extremos de temperatura ambiental de  $-20^{\circ}\text{C}$  até  $37,5^{\circ}\text{C}$ . Esta forma ao ser ingerida por hospedeiro intermediário é rapidamente liberada pelos sucos digestivos, promovendo a invasão de células e a toxoplasmose.

### **3. CICLO BIOLÓGICO**

O ciclo biológico do *T. gondii* é do tipo heteroxeno, pois ocorre em duas fases distintas. Uma fase se passa no hospedeiro definitivo ou completo que, conforme definido por Frenkel e Cols (1970), não é apenas o gato, mas sim os felinos em geral. A outra fase acontece no hospedeiro intermediário ou incompleto que pode ser o homem, outros mamíferos e as aves. A figura abaixo mostra as duas fases do ciclo biológico do *T. gondii*:



O ciclo no hospedeiro definitivo (gato e felídeos jovens) ocorre somente nas células epiteliais, principalmente do intestino delgado. Durante o desenvolvimento desse ciclo ocorre uma fase assexuada (merogonia) e outra sexuada (gamogonia) do parasito. Deste modo, um gato jovem e não imune, infectando-se oralmente por oocistos, cistos ou taquizoítos, desenvolverá o ciclo sexuado (Rey 1991).

Os esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítos, ao penetrarem no epitélio intestinal do gato, sofrerão um processo de multiplicação por endodiogenia e merogonia, dando origem a vários merozoítos. O conjunto desses merozoítos formados dentro do vacúolo

parasitóforo da célula é denominado meronte ou esquizonte maduro. O rompimento da célula parasitada libera os merozoítos que penetrarão em novas células epiteliais e se transformarão nas formas sexuadas masculinas ou femininas: os gametócitos ou gamontes, que, após um processo de maturação, formarão os gametas masculinos, (microgametas) e os gametas femininos (macrogametas). O macrogameta (imóvel) permanecerá dentro de uma célula epitelial, enquanto os microgametas (móveis) sairão de sua célula e irão fecundar o macrogameta, formando o ovo ou zigoto. Este evoluirá dentro do epitélio formando uma parede externa dupla, dando origem ao oocisto. A célula epitelial sofrerá rompimento em alguns dias, liberando o oocisto ainda imaturo. Esta forma alcançará o meio externo juntamente com as fezes onde sofrerá um processo de maturação denominado esporogonia, após um período de cerca de quatro dias, e apresentará dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada. O gato jovem e infectado é capaz de eliminar oocistos durante um mês, aproximadamente. O oocisto, em condições de umidade, temperatura e local sombreado favorável, é capaz de se manter infectante por cerca de 12 a 18 meses (Kauzoe 2002).

O tempo decorrido entre a infecção e o aparecimento de novos oocistos nas fezes dos felídeos (período pré-patente) dependerá da forma do parasito ingerido. Este período será de três dias, quando a infecção ocorrer por cistos, 19 ou mais, por taquizoítos e 20 ou mais dias, por oocistos (Amato & Marchi 2002)

O hospedeiro intermediário (homem, por exemplo) ingerindo oocistos maduros contendo esporozoítos, taquizoítos eliminados no leite, ou, ainda, cistos contendo bradizoítos encontrados na carne crua ou mal cozida, poderá adquirir o parasito e desenvolver a fase assexuada. As formas de taquizoítos que chegam ao estômago serão destruídas, mas as que penetram na mucosa oral poderão evoluir do mesmo modo que os cistos e oocistos.

Cada taquizoíta, esporozoíta ou bradizoíta sofrerá intensa multiplicação, após rápida passagem pelo epitélio intestinal e penetrará em vários tipos de célula do organismo, formando um vacúolo citoplasmático (vacúolo parasitóforo) onde sofrerão divisões sucessivas por endodiogenia, formando novos taquizoítos (fase proliferativa), que irão romper a célula parasitada, liberando novos taquizoítos, que invadirão novas células. Essa disseminação do parasito no organismo ocorre através de taquizoítos livres na linfa ou no sangue circulante, que poderão provocar um quadro polissintomático, cuja gravidade dependerá da quantidade de formas infectantes adquiridas, cepas do parasito e da suscetibilidade do hospedeiro. Essa fase inicial da infecção – fase proliferativa – caracteriza a fase aguda da doença. Neste ponto, a evolução poderá ir até a morte do hospedeiro, o que poderá ocorrer em fetos ou em indivíduos com comprometimento imunológico, ou diminuir e cessar pelo aparecimento de resposta imune específica. Com o aparecimento da imunidade, os parasitos extracelulares desaparecem do sangue, da linfa e dos órgãos viscerais, ocorrendo uma diminuição intracelular (Amato & Marchi 2002).

Alguns taquizoítos, no entanto, invadem as células, mas desenvolvem, após proliferações iniciais, uma cápsula cística na parede do vacúolo parasitóforo, diminuindo seu metabolismo e transformando-se em uma forma de metabolismo mais baixo, os bradizoítos, que pela constante resposta imunológica permanecem no interior do cisto sem despertar sintomatologia significativa do hospedeiro por meses, anos e provavelmente décadas, segundo Dubey & Frenkel (1976). Essa imunidade limita a progressão da infecção e o desenvolvimento de novas lesões, porém não erradica os cistos já existentes encontrados em múltiplos órgãos, sendo formas de resistência do parasita. Os cistos teciduais ocasionalmente se rompem liberando os bradizoítos, que podem evoluir para taquizoítos e reinfectar células vizinhas, despertando reação

inflamatória, com rápido controle pelo sistema imune. Caso o hospedeiro esteja com a resposta imune comprometida, o bloqueio imune dessa proliferação pode não ser eficiente, desenvolvendo-se um processo localizado de toxoplasmose. Além do mais, esses parasitas podem ser ingeridos por felinos não imunes, infectando-os (Kauazoe 2002).

Outra possibilidade são as transmissões congênitas, que ocorre no período gestacional principalmente durante a infecção aguda. Fora desse período, tem sido descrita em gestações sucessivas (Garcia 1979) e em gestantes com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), que já tiveram toxoplasmose em alguma fase de sua vida e que estão com uma depressão imune grave (Bearman et al. 1996).

Para que ocorra a contaminação fetal, necessita-se de taquizoítos circulantes que invadam a placenta, levem a uma infecção inicialmente placentária (placentite) e subsequentemente, fetal. Isso ocorre após um período de tempo variável, que depende da agressividade da cepa, do número de organismos que invadiram a placenta, da resposta imune do organismo invadido e da intensidade dessa resposta inflamatória do feto, responsáveis por uma agressividade maior ou menor da infecção fetal. Por outro lado, a resposta imune do feto é imatura e depende da idade gestacional do concepto. No início da sua vida ainda não apresenta maturidade para combater qualquer infecção, além de ainda não possuir defesa imune materna originada por passagem de anticorpos da classe IgG através da placenta. Uma infecção nesse período da vida poderia ter uma evolução devastadora (Boyer et al. 1998).

#### 4. MECANISMOS DE TRANSMISSÃO

O homem se infecta por via oral, através de transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão acidental por auto inoculação em laboratório e por transmissão transplacentária.

A infecção por via oral pode ocorrer através de: ingestão de oocistos presentes em jardins, caixas de areia, latas de lixo ou alimentos contaminados; ingestão de cistos contendo bradizoítos, encontrados em carne crua ou mal cozida; ingestão de taquizoítos em leite contaminado. Segundo Frenkel (1973), cistos permanecem viáveis em tecidos mantidos em refrigerador à temperatura aproximada de 4°C por um período de 30 dias.

A transmissão através de transfusão sanguínea (sangue total e leucócitos) e transplante de órgãos ocorre quando o doador é soropositivo e o receptor é soronegativo. Nesses casos, a transmissão ocorrerá se o receptor estiver com a resposta imunitária celular deficiente, estabelecendo uma infecção de caráter oportunista, algumas vezes de extrema gravidade. Pode ocorrer também, a reativação da infecção em decorrência da imunodepressão.

A transmissão transplacentária é a forma mais grave de transmissão, pois o feto é um organismo vulnerável do ponto de vista imunológico e suas conseqüências podem ser muito graves, quanto à qualidade de vida do sobrevivente, como cegueira, surdez, invalidez e deficiência mental, mesmo nos nascidos assintomáticos ou oligossintomáticos. Geralmente ocorre durante a primo-infecção materna, embora existam relatos de que possa acontecer também durante a fase crônica da infecção (Frenkel 2002). Em 1992, Wilson e Remington afirmaram que a chance de transmissão materno-fetal depende de três fatores presentes conjuntamente: parasitemia materna inicial ou recorrente, maturidade da placenta e competência da resposta imunológica

materna ao *T. gondii* classificada em completa, deficiente ou ausente. A transmissão do *T. gondii* da mãe para o feto ocorre em variável percentual (30% a 72% dos casos) e depende de vários fatores, incluindo a idade gestacional em que ocorreu a infecção aguda na mãe (Desmonts et al. 1985).

Gestantes imunossuprimidas, como as portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV), de doença de Hodgkin ou acometidas por lupus eritematoso sistêmico em uso de corticoterapia, mesmo estando na fase crônica da infecção pelo *T. gondii*, apresentam risco de transmiti-la aos seus conceptos. Como o número de mulheres soropositivas para o HIV em idade fértil vem crescendo, grande é a preocupação com a transmissão congênita da toxoplasmose. Em grávidas soropositivas, tanto para o HIV quanto para o *T. gondii*, estima-se que o risco de transmissão possa ser superior a 50%. O principal mecanismo proposto seria a reativação da infecção, levando a uma parasitemia crônica ou intermitente (Hassl & Tuma 1995).

Desmonts & Couvreur (1974) estudaram 180 gestantes, dividindo-as em três grupos de acordo com o trimestre em que provavelmente adquiriram a infecção. O parasita foi transmitido para 17% dos fetos quando a infecção foi adquirida no primeiro trimestre, em 24% dos fetos no segundo trimestre e 62% no terceiro trimestre. Os autores observaram também que, apesar de menos freqüente, a doença neonatal era mais grave, quando a mãe era infectada no primeiro trimestre da gravidez. Em contrapartida quando a infecção materna acontecia no último trimestre, a doença fetal ocorria com maior freqüência e com apresentação quase sempre subclínica. Portanto, no decorrer da gestação aumenta o risco de transmissão vertical e diminui a gravidade aparente do acometimento fetal. Isso porque, mesmo nos recém-nascidos assintomáticos, os sintomas podem aparecer ao longo da vida do infectado, podendo chegar a déficits visuais progressivos e deficiência mental, conseqüente a meningoencefalite, que aparece

em 60% dos infectados que não apresentam sinais clínicos muito evidentes, ao nascimento, de comprometimento do sistema nervoso central ( Boyer et al. 1998).

## 5. PERFIS E MARCADORES SOROLÓGICOS DA TOXOPLASMOSE

As respostas imunes de um hospedeiro à toxoplasmose são complexas e envolvem mecanismos humoral e celular. Quando um hospedeiro se infecta com o parasito, ocorre a multiplicação na porta de entrada e logo em seguida ocorre a sua disseminação por todo o organismo através das vias sanguínea e linfática. Durante este período, inicia-se a formação de anticorpos específicos e o desenvolvimento de mecanismos imunocelulares que são responsáveis pela destruição dos taquizoítos extracelulares. Como consequência, durante a fase crônica da toxoplasmose, somente os bradizoítos ou taquizoítos intracelulares persistem e são responsáveis pela manutenção de títulos sorológicos que podem durar toda a vida do hospedeiro (Kauazoe 2002).

Ainda na vigência da parasitemia, observada nas primeiras semanas da primoinfecção, surgem anticorpos específicos representados por isotipos IgM, IgA, IgE e IgG. No início da infecção do hospedeiro as imunoglobulinas da classe IgM, IgA e IgE aparecem primeiro, podendo ser detectadas pelas reações sorológicas dentro de oito a 12 dias após a infecção aguda pelo *T. gondii*. A pesquisa de IgM e IgA em recém-nascidos é utilizada para o diagnóstico de toxoplasmose congênita, pois não atravessam a placenta e quando presentes no soro indicam a produção pelo próprio feto, em resposta a uma infecção intra-uterina (Camargo 2001).

Na evolução da infecção configura-se um perfil sorológico de transição, com níveis elevados de anticorpos IgG, de afinidade crescente. Estão ausentes os anticorpos IgA, IgE, podendo os anticorpos IgM ocasionalmente estarem presentes em baixos



títulos. Progressivamente, este quadro sorológico dá lugar ao perfil de infecção latente ou crônica, que em geral se mantém por toda a vida, com níveis de IgG em baixos títulos e com alta avidéz e ausência dos anticorpos de outros isotipos, ainda que ocasionalmente se encontrem resíduos de IgM. A transição do perfil sorológico de infecção recente para o perfil de infecção latente é mais ou menos lenta, em semanas ou meses, dependendo do estado imunitário dos pacientes (Camargo et al. 1977).

A passagem da IgG específica pela placenta dificulta o diagnóstico da infecção congênita, pois sua presença no sangue do lactente pode refletir a imunoglobulina materna que foi passada via transplacentária durante a gestação como proteção, ou se referir à produzida pelos mecanismos de defesa imune da criança. No entanto, a comparação dos títulos dos anticorpos do binômio mãe-filho pode diferenciar essa situação quando o recém-nascido apresentar níveis de IgG maiores do que os da mãe em no mínimo quatro diluições. A dificuldade na interpretação dos valores de IgG continua durante o acompanhamento da criança porque o anticorpo de origem materna pode persistir no sangue do lactente por um ano. Mas a sua persistência em títulos significativos com o passar dos meses, indica produção pela criança porque os níveis oriundos da mãe são decrescentes com o tempo. Após um ano, sua presença no sangue da criança significa que o sistema imune dela foi estimulado pelo *T. gondii*, e, portanto houve infecção (Boyer et al. 1998).

## 6. DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

### 6.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Os sintomas da toxoplasmose aguda em gestantes podem ser transitórios e inespecíficos. Quando estão presentes, no máximo em 10% dos casos, geralmente limitam-se à linfadenopatia e à fadiga. A adenopatia pode persistir durante meses e comprometer apenas um único linfonodo. Menos frequentemente, tem sido descrita uma síndrome do tipo mononucleose caracterizada por febre, mal-estar, faringite, cefaléia, mialgia e linfocitose atípica (Wong & Remington 1994). A toxoplasmose em grávidas, mesmo se tratando de um organismo com deficiência imune fisiológica, não é preocupante para a mãe. A preocupação é com o organismo em formação, pelo risco de lesões congênitas, resultantes principalmente da destruição do tecido nervoso, que em algumas ocasiões podem ser representadas por microcefalia e cegueira, déficit mental com futuros problemas de comportamento. Essas repercussões frisam a importância dos testes laboratoriais pré-natais para definir o estado imunitário da mãe frente às infecções que podem apresentar perigo ao feto.

O diagnóstico da toxoplasmose não poderá ser estabelecido com base em dados puramente clínicos. Há sempre necessidade de confirmação laboratorial e a devida interpretação dos dados apurados. Isso porque a infecção humana pelo *T. gondii* é muito freqüente e, na maioria dos casos, benigna, assintomática ou apenas aparente através de manifestações subclínicas. No entanto, por vezes, assume aspectos mais expressivos e até mesmo graves.

A forma mais comum da protozoose quando adquirida na vida extra-uterina por organismo imunocompetente, é a ganglionar, que corresponde a processo febril com adenopatias e comum hepatoesplenomegalia. Contudo, trata-se de infecção pleomorfa,

podendo causar, em indivíduos imunodeprimidos, encefalite, mielite, miocardite, pneumonia intersticial e outros comprometimentos (Amato & Marchi 2002).

A possibilidade de transmissão fetal é remota quando a toxoplasmose é adquirida antes da concepção. Mas durante a gestação o risco de transmissão para o feto no primeiro trimestre é de 6%, no segundo, de 29% a 40%, no terceiro, de 59% a 72%. Cerca de 50% dos recém-nascidos de mães que soroconverteram durante a gravidez são infectados e só 10% é que tem manifestações clínicas (Hinrichsen 2005). No primeiro trimestre, a toxoplasmose tem sido responsabilizada por óbito intra-uterino (Desmonts & Couvreur 1974). Entretanto, esta ocorrência em pacientes com infecção crônica é rara e não significativa (Remington et al. 2001).

A infecção que se manifesta no período neonatal é caracterizada pela tríade clássica de Sabin composta por hidrocefalia ou microcefalia; coriorretinite bilateral, macular ou perimacular, simétrica; calcificações intracranianas e retardamento mental. No entanto, estes achados estão presentes em apenas 10% dos recém-nascidos. É conveniente ainda referir que, em alguns recém-nascidos gravemente acometidos, desenvolvem-se manifestações hemorrágicas de vários tipos, além de outras manifestações menos citadas, como nistagmo, estrabismo, microftalmia, pneumonia intersticial, miocardite, envolvimento de supra-renais, hipertrofia de linfonodos, alterações endócrinas e gastrointestinais, com repercussões traduzidas por mixedema, diabetes insípido e puberdade precoce (Veronesi 1982).

Com finalidade didática, podem-se dividir as formas graves em neurológica e generalizada, sendo descritas no estudo clássico de Eichenwald (1959). Dentre os 108 pacientes com a forma neurológica, o autor encontrou retinocoroidite em 102 (94%), alterações líquóricas em 59 (55%), convulsões e calcificações cerebrais em 54 (51%), hidrocefalia em 31 (29%) e icterícia com esplenomegalia em 22 (21%) crianças. Nos 44

pacientes com a doença generalizada, icterícia e esplenomegalia estiveram presentes em 37 (85%), retinocoroidite em 29 (66%), calcificações cerebrais em 2 (5%) e hidrocefalia em nenhuma criança. A taxa de letalidade encontrada foi de 12%. Dentre os sobreviventes, 101 pacientes foram acompanhados pelos menos por quatro anos, sendo 70 crianças com doença neurológica e 31 com a forma generalizada. No grupo de 70 pacientes com a forma neurológica, 62 (89%) tinham retardo mental, 58 (83%) apresentavam convulsões, hipertonia e paralisia, 48 (69%) eram portadoras de deficiência visual grave, 31 (44%) tinham hidrocefalia e microcefalia e 12 (17%) apresentaram surdez. No grupo de 31 crianças com doença generalizada, o retardo mental, convulsões, hipertonia e paralisia estiveram presentes em 25 (81%), deficiência visual grave em 13 (42%), surdez em 3 (10%) e hidrocefalia em 2 (6%) pacientes.

A grande maioria dos neonatos com toxoplasmose congênita têm doença subclínica ao nascer. Contudo, estes recém-nascidos podem apresentar anormalidades da retina e do sistema nervoso central quando são submetidos a exames especializados. Ademais, estes pacientes apresentam riscos de seqüelas oftalmológicas e neurológicas graves em longo prazo (Wilson et al. 1980; Guerina 1994).

A concreta possibilidade de crianças congenitamente infectadas não exibirem distúrbios detectáveis clinicamente ou através de exames subsidiários constitui condição que merece conveniente atenção, já que encerra potencial evolutivo. A toxoplasmose congênita pode permanecer latente por vários anos e, não excepcionalmente, durante a puberdade (talvez por influência hormonal) ou mais adiante, reativar. Os distúrbios oculares e neurológicos são exemplos clássicos observados neste tipo de reativação clínica (Amato & Marchi 2002).

O diagnóstico clínico da toxoplasmose congênita é, por vezes, impreciso, pois as manifestações clínicas podem ser confundidas com as causadas por outros agentes como

o *Citomegalovírus*, *Herpes simples*, *Rubéola*, *HIV*, *Epstein Barr*, *Treponema pallidum*, *Listeria monocytogenes*, *Borrelia burgdorferi*, *Trypanosoma cruzi*. Outras doenças também podem apresentar sinais clínicos semelhantes como a eritroblastose fetal e determinadas doenças degenerativas (Sáfadi 2000). O exame clínico apenas sugere a eventualidade dessa etiologia, mesmo na toxoplasmose sintomática (Rey 1991), ficando a sua confirmação a cargo de exames laboratoriais que identifiquem o parasita ou a presença de anticorpos específicos que não atravessam a barreira placentária (IgA, IgM ou IgE) no sangue do suspeito. Já os níveis de IgG quando diferenciados dos maternos também sugerem a infecção.

Com relação à toxoplasmose ocular podem-se identificar duas formas distintas, a congênita e a adquirida. Em ambas, o acometimento pode ser precoce ou tardio, podendo em alguns casos, manifestar-se clinicamente pela primeira vez, anos depois da infecção sistêmica (de Vroede et al. 1979). A identificação de retinocoroidite pela fundoscopia ocular é muito freqüente, mesmo nos casos sem outros sintomas, e permite realizar o diagnóstico presuntivo de infecção congênita. Contudo, a doença é comumente confirmada através de testes sorológicos, devido à dificuldade de se fazer o diagnóstico clínico ou parasitológico. As dificuldades aparecem porque a retinocoroidite pode ser causada por mais de quinze doenças infecciosas oculares, como sífilis e herpes, mas a toxoplasmose se constitui em principal suspeita. Sua confirmação depende da identificação de anticorpos específicos no sangue do suspeito (Amato & Marchi 2002).

Em imunodeprimidos, as manifestações clínicas citadas são encontradas com freqüência. Talvez pela reativação das formas latentes dos cistos de bradizoítos presentes nesses diferentes órgãos, revelando ser o *T. gondii* um agente oportunista. Há de salientar-se que com a extensão da SIDA (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida)

ficou claro que a toxoplasmose em pacientes infectados pelo HIV tem como órgão de agressão primária, o sistema nervoso central (Amato et al. 1995).

## **6.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

Classicamente, o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose tem se baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasita através de testes sorológicos. Segundo as características desses anticorpos, diferentes marcadores sorológicos, têm sido descritos para distinguir entre infecção latente, comum na população, e infecção recente ou toxoplasmose-doença (Contreras et al. 2000).

Outras respostas se esperam, também, da sorologia da toxoplasmose, como datar na gestante seu contágio pelo toxoplasma ou, no imunocomprometido, a reagudização de uma toxoplasmose latente. Por tais interrogações, a sorologia da toxoplasmose apresenta-se como uma das mais complexas, em contínua evolução, exigindo uma variedade de testes e experiência para a interpretação de seus resultados. Entretanto, a evidenciação do parasita, por isolamento a partir do material do paciente, ou pela demonstração de seus componentes, como antígenos ou segmentos do DNA, é de alto valor diagnóstico, especialmente nos imunodeficientes, seja por imunodepressão, como nos aidéticos ou transplantados, ou por imunoimaturidade como no feto e no recém-nascido (Camargo 2001).

### 6.2.1. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA TOXOPLASMOSE.

A pesquisa do parasita e de seus componentes pode ser feita por: inoculação em camundongo, isolamento em cultura de células, pesquisa de antígenos no soro, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

*Inoculação em camundongo* – Utiliza o sangue do paciente, de preferência a camada leucocitária, ou sedimento do centrifugado de líquido cefalorraquiano, líquido amniótico, lavado brônquico-alveolar, suspensões de triturados de biópsia ou de placenta, que são inoculados por via intraperitoneal em camundongos isogênicos (Remington et al. 1994).

A positividade é indicada pela soroconversão do animal e confirmada pelo achado de taquizoítas no líquido peritoneal ou, mais freqüentemente, de microcistos no cérebro e outros órgãos, evidenciados em cortes de tecido por imunohistoquímica, o que, entretanto, pode exigir passagens “cegas” para novos camundongos, inoculados com triturados de órgãos do primeiro. Os prazos longos para a obtenção de resultados, de 30 ou mais dias, são compensados pela alta sensibilidade do teste (Camargo 2001).

*Isolamento em Cultura de Células.* Os materiais suspeitos são semeados em culturas de células, como fibroblastos humanos ou várias outras linhagens celulares. O desenvolvimento dos toxoplasmas no interior das células pode ser evidenciado com facilidade por imunofluorescência no tecido em prazos curtos, de até uma semana. Porém, essa técnica é menos sensível do que a inoculação no camundongo (Derouin et al. 1987).

*Pesquisa de antígenos.* O material antigênico do toxoplasma, bem como complexos imunes parasitários, podem ser detectados no soro na fase aguda da toxoplasmose (Van Knapen et al. 1985). Porém, pela transitoriedade e inconstância da

antigenemia, sua pesquisa é de pouco valor diagnóstico, limitação possivelmente solucionada pela pesquisa de antígenos na urina, de que tem sido referida boa sensibilidade na neurotoxoplasmose. O parasita ou seus antígenos podem também ser evidenciados em cortes de tecidos, por imunohistoquímica, utilizando-se anticorpos específicos e coloração imunofluorescente ou imunoenzimática.

*Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)* - Ainda que o *T. gondii* esteja presente em número extremamente reduzido, ou mesmo quando lisado pode ser identificado pela detecção de segmentos característicos de seus ácidos nucléicos, depois de amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase. Dispendioso e exigindo controles rigorosos para evitar resultados falsos, este teste vem se tornando mais prático, pois atualmente pode ser concluído em menos de 48 horas. Entretanto, a técnica não está definitivamente padronizada, quanto aos procedimentos de extração dos ácidos nucléicos ou aos segmentos ampliados, com resultados por vezes heterogêneos entre laboratórios diferentes (Pelloux et al. 1998) e para diferentes aplicações diagnósticas. Assim, para identificação do toxoplasma, podem ser amplificados vários segmentos do DNA, correspondentes a diferentes genes, como P30, TRG1, B1 ou DNA ribossomal, preferidos pela maior sensibilidade.

A pesquisa pode ser realizada no líquido amniótico, no sangue de cordocentese do feto, em sangue periférico de recém-nascidos, em material de biópsia cerebral ou no líquido cefalorraquiano e em material de lavagem bronco-alveolar. Um resultado positivo, entretanto, não permite distinguir entre taquizoítos e formas císticas, mas isso no produto conceptual não tem importância, pois o achado do parasita, independente de sua forma é diagnóstico de infecção congênita. Também o fato de se encontrar em fase aguda ou crônica não interfere na conduta terapêutica, mas apenas na intensidade das seqüelas, que serão maiores no caso do feto já se encontrar em fase crônica da infecção.



A possibilidade futura desta distinção é acenada, porém, pela constatação de diferenças entre antígenos e expressões gênicas de ambas as formas do parasita (Ambroise-Thomas & Okay 1993).

### **6.2.2. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA TOXOPLASMOSE**

Classicamente, o diagnóstico da toxoplasmose é baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasita através dos testes sorológicos. A pesquisa de diferentes classes de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA e IgE) anti-toxoplasma constitui o principal método laboratorial para o diagnóstico da doença. Além disso, a presença dos anticorpos anti-toxoplasma no curso da infecção permite a análise de perfis sorológicos, seja de infecção recente, em fase aguda, ou de infecção antiga, em fase de latência ou crônica (Contreras et al. 2000).

Em indivíduos imonocompetentes os testes sorológicos com pesquisa de IgG e IgM são suficientes para o diagnóstico, por serem sensíveis, específicos e de fácil execução (Camargo 2001). Porém, para o diagnóstico em adultos imunocomprometidos e na infecção fetal, há necessidade da realização de testes, como os descritos no item anterior, para a detecção *do Toxoplasma gondii*.

Existem dois tipos principais de testes sorológicos: os que usam organismos inteiros como antígenos e aqueles que utilizam extratos antigênicos de parasitas lisados. Os primeiros são representados pelo teste do corante de Sabin Feldman, pela Imunofluorescência Indireta e pelo ensaio de aglutinação por imunoabsorção de IgM, que demonstram principalmente anticorpos dirigidos contra os antígenos da membrana do parasita. Os demais que usam o extrato antigênico de parasitas lisados incluem o teste de hemaglutinação passiva e o ensaio imunoenzimático (Duffy et al. 1989).

A **Reação de Sabin-Feldman**, também conhecida como teste do corante ou *dye test*, foi o método sorológico clássico de diagnóstico da toxoplasmose. Sendo a primeira prova de alta sensibilidade desenvolvida, mostrou-se capaz de evidenciar e quantificar, por diluição do soro, anticorpos "antiparede". Tem como fundamento o fato de que toxoplasmas do exsudato peritoneal de camundongos corados pelo azul-de-metileno, em meio alcalino (pH 11), vistos à microscopia óptica apresentam parasitas com intensa coloração que assumem forma arredondada ovóide, mas, quando incubados em presença do denominado fator acessório, o fenômeno é impedido pela presença de anticorpos específicos no sangue sob análise, os parasitas extracelulares perdem sua afinidade tintorial, ficando o núcleo corado, o citoplasma incolor e, morfológicamente, mais delgados, falciformes. O resultado imanente a cada determinação corresponde à diluição do soro que impede a coloração. O fator acessório é soro humano sem anticorpos, possuidor de propriedades capazes de tornarem possível a ocorrência do fenômeno básico da reação (Sabin & Feldman 1948).

O teste do corante, de execução trabalhosa e com baixo rendimento, encerra algumas dificuldades, como: necessidade do uso de toxoplasmas vivos e infectantes, presentes no exsudato peritoneal de camundongos inoculados cerca de 48 horas antes; interferência do número de protozoários utilizados; influência do tamanho dos animais (os maiores não são satisfatórios); leitura microscópica dos materiais dos diferentes tubos, correspondentes às diferentes diluições. Também ocorre a participação de fatores diferentes dos apontados, às vezes imponderáveis e nem sempre devidamente previsíveis como a dependência da utilização de camundongos seguramente não-infectados e o risco de contaminação laboratorial acidental. Esse método é pouco prático no que concerne à realização de inquéritos. Ao ser executado, necessita da elaboração bem recente de preparações indispensáveis, como azul-de-metileno, assim

como tem na contagem de parasitas corados ou não, etapa realmente difícil e cansativa. Além de todos esses inconvenientes, sofre a influência de critérios de observação variáveis entre diferentes técnicos (Camargo 2001).

A **Reação de Fixação de Complemento (RFC)** raramente é executada, pois os anticorpos que mede são de aparecimento tardio (semanas mais tarde que o teste do corante) e um teste positivo não prova que a infecção é aguda ou um resultado negativo não afasta a possibilidade de infecção. No entanto, pode ser realizada nos casos em que já são demonstráveis títulos elevados e estáveis de anticorpos pela Imunofluorescência Indireta, para se demonstrar a subida dos títulos. Pode tomar-se negativa após poucos anos da infecção aguda, mas geralmente permanece positivo por um período de dez anos (Remington et al. 1995).

O teste de **Hemaglutinação Indireta** descrito originalmente por Jacobs e Lunde (1957) com hemácias de carneiro recobertas por componentes do parasita, principalmente citoplasmáticos, apresentava baixa sensibilidade. Este teste não detectava IgM ou IgG de baixa avidéz, além de sofrer a interferência de anticorpos heterófilos com conseqüente resultado falso-positivo. Tais falhas foram solucionadas ao se utilizarem hemácias de aves recobertas com antígenos completos do parasita aglutináveis por anticorpos IgG e IgM, tornando o teste altamente sensível. É considerado um teste prático de baixo custo, não exigindo equipamento sofisticado e um bom método para triagem da toxoplasmose. Ocasionalmente, observam-se resultados falso-positivos por interferência de anticorpos IgM "naturais", aglutininas IgM não-específicas, em geral de títulos baixos. Distingue-se de reações específicas por permanecer com títulos inalterados, enquanto aquelas se elevam em poucos dias na fase aguda da toxoplasmose (Camargo et al. 1989).

O teste de **aglutinação direta** é usado para a detecção de anticorpos antitoxoplasma, com suspensões de toxoplasmas fixados por formaldeído ou por acetona (Thulliez et al. 1986). A aglutinação dos taquizoítas fixados por acetona é característica das infecções recentes, sendo utilizada para distingui-las de infecções latentes. Para o teste de aglutinação do látex são utilizadas partículas recobertas por antígenos do parasita, seu uso sendo bastante restrito.

A reação de **Imunofluorescência Indireta** é considerada de boa especificidade e sensibilidade, comparável ao teste do corante de Sabin-Feldman. Essa reação tem a vantagem de utilizar toxoplasmas preservados, fixados em lâminas de microscopia, tornando-o muito mais prático e seguro para a rotina laboratorial, quando comparada ao dye test. Além do mais, esse teste permite a identificação dos anticorpos segundo as classes de imunoglobulinas. Pode apresentar resultados falso-positivos de anticorpos IgM pela interferência de fatores reumatóides, eventualmente presentes no soro. Os testes para anticorpos IgM podem também revelar resultados falso-negativos, devido à competição entre os anticorpos IgG e IgM, impedindo que estes se fixem aos antígenos parasitários (Camargo et al. 1972). Em cerca de 75% dos casos de recém-nascidos com toxoplasmose congênita podem ocorrer resultados falso-negativos, consequência de altos títulos maternos de anticorpos da classe IgG.

A reação de **Agglutinação por Imunoabsorção (ISAGA)** é utilizada para identificação de anticorpos IgM, sendo importante no diagnóstico de infecção aguda. Os antígenos adicionados às placas constituem-se em uma suspensão de toxoplasmas, que se aglutinam na presença de IgM específica (Desmonts et al. 1981).

A introdução do **Ensaio Imunoenzimático (ELISA)** trouxe um grande avanço para o diagnóstico da doença. Em 1978, Camargo et al. descreveram a técnica para anticorpos IgG e IgM, observando porém, presença de resultados falso-positivos para

IgM em pacientes portadores do fator reumatóide. Naot e Remington (1980) desenvolveram uma técnica para detecção de IgM, denominada de ELISA duplo sanduíche (DS - ELISA IgM) ou teste de captura de IgM. Através dela foi possível detectar a presença de IgM específica para *T. gondii* em 92% dos indivíduos com toxoplasmose recentemente adquirida, e que eram negativos na reação de Imunofluorescência para IgM.

A técnica **ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)** é um teste automatizado no sistema VIDAS da Bio-Mérieux usada para detecção de anticorpos da classe IgG e IgM anti *T. gondii*. O princípio de doseamento associa o método imunoenzimático com uma detecção final em fluorescência. Os anticorpos da classe IgM são pesquisados por imunocaptura. As imunoglobulinas IgM antitoxoplasma são detectadas especificamente graças a um imunocomplexo marcado com fosfatase alcalina. Este método quando comparado com o método ISAGA apresentou sensibilidade de 93,5%, especificidade de 99,3% e concordância de 98,9% (Manual de Instruções de Uso VIDAS Bio-Mérieux, 1998).

A técnica **MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay)** é usada para a determinação quantitativa de anticorpos da classe IgG e IgM antitoxoplasma no soro ou plasma humano. A reação é realizada no analisador de imunoensaio, com acesso randômico e contínuo, AXSYM da Abbott. As amostras usadas para pesquisa dos anticorpos da classe IgM são tratadas com tampão de neutralização do Fator Reumatóide (RF), para remover os anticorpos de interferência (se presentes) do complexo antígeno-anticorpo, a fim de se evitar resultados falsamente positivos. Ao final da reação, o complexo imune ligado ao conjugado marcado com a fosfatase alcalina reage com o substrato 4-Metil Umbeliferil Fosfato (MUP). A fosfatase alcalina cataliza a hidrólise do MUP a MU (Metil Umbeliferil). A quantidade de MU

fluorescente é proporcional à concentração de anticorpos da amostra analisada (Manual de Instruções de Uso AxSYM-Abbott, 2000).

No início da década de noventa, foi desenvolvido o teste de **ELISA IgG para avides**, que tem se mostrado excelente método de diagnóstico de infecção aguda adquirida. Este método avalia a avides de ligação ao antígeno dos anticorpos IgG contra o *T. gondii*, separando os anticorpos de baixa avides, produzidos numa fase inicial da infecção, dos anticorpos de alta avides, indicativos de infecção crônica (Joynson et al. 1990).

A avides com que os anticorpos IgG ligam-se a seus respectivos antígenos pode ser avaliada pela maior ou menor facilidade de quebra dessa ligação. Mede-se por um teste imunoenzimático ELISA-IgG modificado, pela dissociação dos complexos antígenos-anticorpos formados e liberação dos anticorpos IgG de baixa avides, por meio de uma solução caotrópica, por exemplo de uréia 6M (ELISA-uréia). Para este fim, após a incubação do soro na placa, essa é lavada com a solução de uréia e, em seguida, prossegue-se a reação pela incubação com o conjugado enzimático. Uma baixa avides é indicada por acentuada diminuição do título com relação ao título original obtido sem o tratamento pela uréia (Camargo et al. 1991).

A reação de **Western blot** tem mostrado que o soro materno e o da criança reconhecem diferentes antígenos do *T. gondii*, quando a criança está congenitamente infectada (Chumptazi et al. 1995). Em 1985, Remington et al já tinham reconhecido antígenos diferentes por anticorpos das classes IgG e IgM pela mãe e filho congenitamente infectado. No paciente com HIV e encefalite, o uso dessa reação mostra diversidade antigênica entre diferentes cepas do *T. gondii*. Anticorpos das classes IgM e IgA podem ser identificados contra a principal proteína de superfície do *T. gondii*, a proteína P30, pela técnica de Western blot. Comparando-se a técnica de Western blot

com a imunocaptura ELISA, demonstra-se que a primeira tem vantagens sobre a segunda especialmente no diagnóstico da toxoplasmose cerebral dos pacientes com AIDS (Gross et al. 1992).

Para a pesquisa de anticorpos **IgA e IgE específicos** para a toxoplasmose, utilizam-se as técnicas imunoenzimáticas, tanto a indireta como a de captura. Embora estas reações estejam sujeitas a alguma discrepância de resultado, pois ainda não estão suficientemente padronizadas, vêm assumindo importância crescente como marcadores de infecções recentes inclusive congênicas (Decoster et al. 1992, Wong et al. 1993).

A IgA específica pode ser detectada no sangue de adultos e crianças congenitamente infectados, usando ELISA ou ISAGA. Sua sensibilidade é maior na identificação da infecção congênita ou agudamente adquirida (Stepick-Biek et al. 1990). Esse método é importante em sangue do cordão umbilical para evitar a contaminação pelo sangue materno, uma vez que o anticorpo não atravessa a barreira placentária e o seu encontro no feto é diagnóstico de infecção congênita. Os títulos permanecem elevados por um período de 26 semanas, praticamente semelhantes à persistência da IgM (Stepick-Biek et al. 1990).

A IgE específica pode ser detectada por Imunoabsorção, podendo também ser usada para o diagnóstico da doença aguda e congênita (Remington & Macleod 1995). Os componentes desse teste são: anticorpos monoclonais para IgE humana, amostra do paciente e taquizoítos do *T. gondii* tratados com formalina. Quando os anticorpos IgE específicos anti *T. gondii* estão presentes, ocorre aglutinação visivelmente detectada. Por esse método, podem ser testados soro, sangue fetal, fluido cerebrospinal e fluido amniótico. A persistência do anticorpo específico no sangue materno é detectada até por quatro meses nas pesquisas realizadas, tornando esse método mais seguro do que o da determinação da IgM no diagnóstico da infecção na gestante. Por outro lado, não

atravessa a placenta, e sua presença no sangue do feto ou do recém-nascido é diagnóstica de transmissão congênita da infecção. Entretanto, no sangue de pacientes com toxoplasmose congênita, o anticorpo pode ser encontrado por tempo prolongado (um ano) e durante períodos de recrudescências, após a suspensão da terapêutica com sulfa-pirimetamina (Pinon et al. 1985).

### **6.2.3. DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE NA GESTANTE E NO FETO**

Pelo grande contingente de gestantes desprovidas de anticorpos para o toxoplasma (não raro de 50 a 60% ou mais) há necessidade de repetição dos testes a cada quatro ou cinco semanas nas que permanecem soronegativas. Para essa triagem são necessários testes sensíveis, de execução simples e de baixo custo, capazes de detectar anticorpos IgG e IgM e que possam fornecer resultados em curto prazo. Atualmente dispõe-se de vários sistemas de automação, como VIDAS (Bio-Mérieux), AxSYM (Abbott) e outros, para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-toxoplasma, que tornam simples e rápida a realização dos testes, limitados apenas pelo custo.

Anteriormente considerado inadequado para a triagem de gestantes de risco, pela baixa sensibilidade na fase aguda da toxoplasmose, o teste de Hemaglutinação Indireta, quando realizado com os reagentes atuais, mostra-se muito prático e adequado. De sensibilidade elevada, é capaz de detectar desde 5 UI/ml de anticorpos IgG e de assinalar a presença de anticorpos IgM (Camargo et al. 1989).

A maior dificuldade no diagnóstico sorológico ocorre nos casos em que a IgM está positiva por ocasião da primeira consulta pré-natal. A sua presença nem sempre indica uma infecção aguda recente, pois com o aumento da sensibilidade dos testes sorológicos para toxoplasmose com detecção de IgM por períodos superiores a um ano



após a infecção aguda, recorre-se a outros métodos sorológicos para tentar estabelecer, retrospectivamente o momento da soroconversão. O diagnóstico da infecção aguda nestes casos exige a demonstração de aumento nos títulos de anticorpos, maior ou igual a três diluições, em duas amostras colhidas com intervalo de três semanas e testadas em paralelo. Às vezes há necessidade da realização de outros testes como avidéz da IgG e dosagem de IgA e/ou IgE (Camargo et al. 1991). Idealmente, deve-se utilizar uma combinação de dois testes para confirmação diagnóstica (Remington et al. 2001).

Nas gestantes com quadro clínico sugestivo de toxoplasmose, realizam-se testes que detectam anticorpos IgM específicos, tais como ELISA captura IgM e ISAGA IgM. Estes se positivam usualmente na primeira ou segunda semana de infecção e podem persistir por meses ou anos. Um teste negativo para IgM virtualmente afasta a possibilidade de infecção atual ou recente na gestante (Wallon et al. 1999), mas não diz que não possa ocorrer a transmissão congênita da doença materna recentemente adquirida.

Se os resultados indicam infecção materna aguda, o estabelecimento do envolvimento fetal torna-se crítico (Wong & Remington 1994). O diagnóstico da infecção fetal pelo *T. gondii*, classicamente, baseava-se na análise conjunta do sangue fetal e do líquido amniótico, colhidos a partir da 20<sup>a</sup> semana de gestação aliados à avaliação ultra-sonográfica da morfologia fetal (Daffos et al. 1988). Os achados ultra-sonográficos que podem surgir devido à infecção incluem: hidrocefalia, calcificações intracranianas, aumento da circunferência abdominal pela hepatoesplenomegalia, ascite fetal e aumento da espessura placentária.

Para o diagnóstico de certeza da infecção fetal, há necessidade de testes para a detecção do *T. gondii*. Esta detecção pode ser feita por cultura em células ou inoculação em camundongos, por determinação dos antígenos parasitários através de técnica

imunohistoquímica ou, principalmente, por identificação de seqüências de ácidos nucleicos através da Reação em Cadeia da Polimerase em qualquer tipo de tecido ou fluido corporal (Grover et al. 1990, Hohlfeld et al. 1994).

A sensibilidade da PCR para identificar o *T. gondii* no líquido amniótico antes da 20<sup>a</sup> semana pode ser variável, acreditando-se que possa chegar até 100% (Hohlfeld et al. 1994). A demonstração de material genômico, isto é, de seqüências de DNA, pode fornecer resultados no prazo de um dia, permitindo a identificação de praticamente 100% dos casos (Grover et al. 1990). Entretanto, a técnica ainda não está definitivamente padronizada. A presença de inibidores da PCR no líquido amniótico pode originar resultados falso-negativos, solucionados, porém, pelo ensaio em diluições do líquido ou pela remoção prévia de inibidores. Também, após a 20<sup>a</sup> ou a 22<sup>a</sup> semanas de gestação, o parasita pode ser demonstrado em sangue fetal obtido por cordocentese.

A pesquisa de anticorpos IgG no sangue de cordocentese não tem valor diagnóstico pela presença de anticorpos maternos de transferência passiva, enquanto a pesquisa de anticorpos IgM reveladores de infecção fetal, embora de alta especificidade, é de sensibilidade reduzida, pois se positiva em apenas 20% a 30% de casos, após a 20<sup>a</sup> ou a 22<sup>a</sup> semanas de gestação. Essa porcentagem tende a aumentar com o amadurecimento imunológico do feto, podendo chegar no recém-nascido a 50% ou mais. A pesquisa de anticorpos IgA no sangue de cordocentese tem sido sugerida como mais sensível, de 70% a 90%. No sangue fetal podem-se encontrar indícios indiretos da infecção, como eosinofilia, plaquetopenia e níveis elevados de IgM total e de enzimas, como a gama-glutamil transferase e a desidrogenase láctica (Daffos et al. 1988).

O *T. gondii* pode ser evidenciado mais precocemente pela biópsia de vilosidades coriais. A reduzida probabilidade de infecção fetal nos períodos iniciais da gestação e os maiores riscos desse procedimento não a tornam, em geral, recomendável.

#### 6.2.4. DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE NO RECÉM-NASCIDO

O recém-nascido infectado pelo *T. gondii*, via de regra, apresenta parasitemia que pode ser detectada na camada leucocitária de sangue venoso, pela PCR, em geral durante todo o primeiro mês de vida, principalmente na primeira semana pós-parto, quando a sensibilidade desta técnica é de aproximadamente 90% (Camargo 2001).

No recém-nascido, a resposta humoral pode auxiliar o diagnóstico, sendo muito importante, para este fim o exame tanto do soro da criança como da mãe. Na presença de sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose, altos títulos de anticorpos IgG no recém-nascido, aliados a um perfil materno de infecção recente tem alto valor preditivo positivo de toxoplasmose congênita, mas que deverá ser comprovado pela positividade, na criança, de teste para anticorpos IgM ou pela evidenciação do *T. gondii*.

Outra comprovação, de alta sensibilidade, são perfis diferentes de anticorpos IgG maternos e da criança, no teste de Western blot com antígenos do *T. gondii*. Esses, distribuídos em bandas de pesos moleculares crescentes, são incubados com os soros e, após revelação, identificam-se as bandas com que os anticorpos reagiram. O soro do recém-nascido não infectado irá originar perfil semelhante ao materno, enquanto diverso se infectado, produzindo seus próprios anticorpos, cuja reatividade característica soma-se à da mãe (Chumpitazi et al. 1995). Anticorpos IgM anti-toxoplasma no soro da criança fazem diagnóstico de infecção congênita, exceto nos primeiros 10 dias de vida quando, se presentes no soro materno, podem ter contaminado o sangue do recém-nascido durante o nascimento. Neste caso sua duração é curta, pois a meia-vida da IgM é de cinco dias.

A pesquisa de anticorpo IgM é de baixa sensibilidade no teste clássico de imunofluorescência, de apenas 20% a 30%, e ainda com alto risco de resultados falso-

positivos. Estes são removidos pela precipitação prévia de IgG da amostra, o que também eleva a sensibilidade do teste para cerca de 50%. Mais sensíveis e específicos são os testes de captura de IgM, especialmente os ensaios fluorométricos, como o teste VIDAS-IgM e o ISAGA que atingem sensibilidade de 80% a 90% (Camargo 2001). Como nem todo recém-nascido infectado tem capacidade de produzir anticorpos, nos casos suspeitos recomenda-se que a pesquisa de anticorpos IgM seja repetida um e dois meses após o nascimento (Daffos et al. 1988).

Os títulos de anticorpos IgG caem progressivamente, nos recém-nascidos não infectados, até negatização em prazos de poucos meses a um ano (Thulliez et al. 1992). Porém, nos infectados estes títulos são permanentes ou ascendentes, com exceção dos casos de imaturidade imunológica, quando a criança com toxoplasmose não produz anticorpos, havendo queda dos títulos, podendo chegar a negatização por esgotamento dos anticorpos de transferência passiva, para se elevarem em seguida à medida do despertar da resposta humoral (Remington et al. 1994).

Não se deve esquecer que, em cerca de 80% dos casos, a toxoplasmose congênita é inaparente, assim como foi, freqüentemente, a infecção materna, passando despercebida, mas que será causa de lesões posteriores, principalmente oculares e cerebrais, levando à cegueira e ao retardo mental (Caiaffa et al. 1993), mas que podem ser evitadas ou minimizadas se o tratamento for iniciado ainda no primeiro mês de vida e prolongado por todo o primeiro ano.

Em relação à análise do líquido de recém-nascidos, a presença de anticorpos anti-*T. gondii* é altamente sugestiva de infecção no sistema nervoso central, uma vez que o anticorpo materno não atravessa a barreira hematoencefálica normal e sua presença indica uma lesão de barreira ou produção local do anticorpo (Remington et al. 1995). O

diagnóstico de certeza se estabelece a partir do achado de antígenos de *T. gondii* no líquido.

O diagnóstico definitivo da toxoplasmose nos recém-nascidos pode ser obtido a partir de:

- 1 - Isolamento do parasita em camundongos inoculados com sangue periférico ou líquido do recém-nascido ou ainda de placenta humana. O *T. gondii* dificilmente pode ser demonstrado em sangue periférico após 2 semanas de vida. O método considerado como "padrão ouro" é a associação da cultura e a identificação da expressão da proteína p30 do protozoário;
- 2 - Presença de anticorpos específicos da classe IgM e/ou IgA ou persistência de anticorpos da classe IgG depois dos 12 meses de idade.

## **7. TRATAMENTO**

### **7.1. GESTANTE COM TOXOPLASMOSE AGUDA**

O tratamento precoce da grávida com primoinfecção toxoplásmica é bastante útil no sentido de reduzir o risco de transmissão para o feto ou diminuir a gravidade do acometimento deste. Antes, a única droga preconizada era a espiramicina, pela sua virtual ausência de riscos para o feto. Atualmente associa-se a pirimetamina-sulfadiazina durante a gestação, pondo-se de lado os seus efeitos teratogênicos e/ou tóxicos (na realidade menos comuns do que se supunha), diante da superioridade dos benefícios observados.

O tratamento materno pode prevenir ou atenuar a doença congênita. A espiramicina é indicada para o tratamento de gestantes com infecção aguda cujo feto

não está infectado ou não foi avaliado para o diagnóstico de infecção. Apesar de os estudos que avaliam os resultados em longo prazo ainda não estarem concluídos, o tratamento materno com a espiramicina parece controlar a infecção placentária e reduzir as taxas de transmissão em até 60% (Desmonts & Couvreur 1974). A combinação de sulfadiazina e pirimetamina é indicada para gestantes de idade gestacional superior a 16-21 semanas cujo feto tem infecção confirmada ou muito provável. Segundo estudo realizado em Paris (Hohlfeld et al. 1989), essa associação mostrou-se mais efetiva na redução da gravidade da doença e na melhora no prognóstico fetal e neonatal.

## **7.2. CRIANÇA COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA**

O tratamento da criança infectada sintomática ou assintomática deve ser iniciado precocemente e prolongar-se até no mínimo um ano de idade. Ininterrupto até os dois anos de vida nas crianças que tiverem nascido com seqüelas oculares, auditivas e cerebrais, pois pode minimizá-las e melhorar o prognóstico. Vários esquemas terapêuticos têm sido utilizados no tratamento da toxoplasmose congênita. O esquema de Couvreur, 1984, é o mais difundido e consiste no emprego alternado de espiramicina com sulfadiazina e pirimetamina durante um ano, de acordo com o estado clínico, como descrito abaixo. Comparando com crianças não tratadas, este autor observou menor incidência de recorrência de lesões oculares (18% vs 2,4%) e estabilização da infecção em 40% dos casos graves (Couvreur et al. 1980). Atualmente, tem-se dado maior importância ao tratamento prolongado para diminuir a intensidade das seqüelas.

Os seguintes esquemas terapêuticos podem ser usados:

1. Toxoplasmose congênita sintomática: pirimetamina (1mg/kg/dia) e sulfadiazina (85 mg/kg/dia) nos primeiros seis meses, associados ao ácido folínico injetável na

dose de 5 mg a cada três dias e, após, ciclos de 30 dias alternados de pirimetamina + sulfadiazina e espiramicina (100mg/kg/dia) até 1 ano.

2. Toxoplasmose congênita sintomática com evidência de processo inflamatório (coriorretinite e/ou proteinorraquia elevada – maior que 1g/dl em crianças com menos de um mês): esquema 1 associado à prednisona 1,5 mg/kg/dia, até estabilização do processo inflamatório.
3. Toxoplasmose congênita assintomática: pirimetamina + sulfadiazina durante seis semanas e, após, espiramicina por seis semanas intercalada com quatro semanas de pirimetamina + sulfadiazina até completar um ano.
4. Recém-nascido assintomático com resultado sorológico inconclusivo, cuja mãe teve infecção comprovada durante a gestação: sulfadiazina + pirimetamina durante um mês e reavaliação clínica e sorológica para definir a continuidade ou suspensão do tratamento.
5. Recém-nascido assintomático de mãe com sorologia sugestiva de infecção recente, mas sem dados para definir se a infecção ocorreu durante a gestação: espiramicina durante um mês e reavaliação posterior como no item 4.

Estudo multicêntrico realizado em Chicago, (McAuley et al. 1994), estabeleceu outro protocolo de tratamento para crianças com infecção congênita sintomática. A proposição desse esquema foi motivada por relatos de casos de adultos com imunodeficiência que desenvolveram encefalite pelo *T.gondii* na vigência de profilaxia com espiramicina e somente apresentaram resolução das lesões neurológicas após o uso de múltiplas doses de pirimetamina e sulfadiazina (Leport et al. 1986). Os autores desse novo esquema terapêutico para toxoplasmose congênita partiram da hipótese de que, em crianças em fase de maturação imunológica, o uso combinado e prolongado de sulfadiazina e pirimetamina permitiria um melhor controle das lesões teciduais causadas

pelo parasita. Após quatro anos de acompanhamento das crianças tratadas com o esquema proposto por McAuley, comparativamente às crianças não tratadas e descritas por Eichenwaid et al. em 1959, observou-se redução significativa da ocorrência de deficiência motora nas crianças tratadas (69% vs 22%); convulsões (81% vs 11%); retardo mental (86% vs 32%); hidro e microcefalia (32% vs 26%), sem ter havido, no entanto, diferenças na incidência de deficiência auditiva grave (59% vs 58%) (Roizen et al. 1995). Ainda, outros estudos utilizando sulfadiazina e pirimetamina durante um ano, mostraram resolução ou diminuição das calcificações intracranianas em 75% das crianças tratadas e prevenção da recorrência das lesões oculares.

O esquema abaixo foi proposto por McAuley (McAuley et al. 1994) para tratamento de recém-nascidos com toxoplasmose congênita sintomática:

**Pirimetamina:** 2mg/kg/dia por 2 dias e após, 1mg/kg/dia diariamente por 2 ou 6 meses (crianças com acometimento severo) e após, 1 mg/kg/dia 3 vezes por semana até completar 1 ano.

**Sulfadiazina:** 100mg/kg/dia até completar 1 ano.

**Ácido folínico:** 5 mg 3 vezes/semana; 10 mg 3 vezes/semana nas crianças com idade maior que 1 mês ou peso de 4,5 kg. Na presença de neutropenia ( $750$  a  $900/\text{mm}^3$ ), a dose deve ser aumentada para 10 mg diariamente. Se neutrófilos inferiores a  $500/\text{mm}^3$ , deve-se suspender a pirimetamina e elevar a dose de ácido folínico para 10 a 20 mg/dia.

**Prednisona:** 1mg/kg/dia, 2 doses ao dia, quando há hiperproteinorraquia (1 g/dl) e coriorretinite ativa, até a resolução do processo inflamatório.

Atualmente existe uma tendência de prolongar a medicação clássica (sulfadiazina + pirimetamina + ácido folínico) por um ou dois anos, sem intercalar com a espiramicina, porque essa droga não atinge a barreira hematoencefálica e 60% das crianças tem a meningoencefalite toxoplásmica.



## 8. EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE

A prevalência da infecção toxoplásmica em adultos varia consideravelmente de acordo com a idade e a população estudada (Feldman & Miller 1956). Esta variação pode ser explicada pela diferença de exposição às duas principais fontes de infecção: os cistos teciduais presentes na carne de animais, e os oocistos, disponíveis em solo contaminado por fezes de gatos. A maior prevalência da infecção encontrada na França relaciona-se ao freqüente hábito de ingestão de carne crua ou mal cozida (Desmonts et al. 1965). Nos Estados Unidos a prevalência atinge 10% a 50%, enquanto que na Austrália é de 4%, na Finlândia - 20%, Polônia - 36%, Áustria -37%, Itália - 40%, Etiópia - 48%, Bélgica - 53%, Panamá - 63%, França - 71% e El Salvador- 75% (McCabe & Remington 1988; Aspöck & Pollack 1992; Roos et al. 1993).

No Brasil, na década de sessenta, investigação realizada em Belo Horizonte por Araújo (1970) em soros de 729 adultos revelou 50% de positividade à reação Sabin-Feldman. No final da década de oitenta, Vaz et al. (1990) encontraram em 481 gestantes, ao primeiro atendimento em centro de saúde da área metropolitana de São Paulo, soropositividade de 67%. Já na década de noventa, várias investigações foram publicadas. Na cidade de Porto Alegre, estudo coordenado por Neves et al. (1994), em 812 gestantes, encontrou positividade para toxoplasmose de 54%. Estudo coordenado por Pedreira (1995) em 1993 e 1994, através de triagem sorológica para toxoplasmose em 2.330 gestantes por ocasião da primeira consulta pré-natal em Hospital Universitário de referência do município de São Paulo, constatou a prevalência de anticorpos específicos para toxoplasmose em 65% de 175 gestantes. Em Belém, estudo feito no Instituto Evandro Chagas por Carmo et al (1997) em um grupo de 192 grávidas, revelou que 71% eram soropositivas. Outra pesquisa realizada por Brisighelli Neto (1998) em

397 gestantes, na cidade de Bragança Paulista no Estado de São Paulo, constatou soroprevalência de 55%. Nóbrega (1998), em Recife, ao estudar 1.309 grávidas, encontrou o valor de 69%.

Bichara (2001), em estudo desenvolvido no ambulatório do Programa de Toxoplasmose do Instituto Evandro Chagas com 656 gestantes procedentes da área metropolitana de Belém, detectou prevalência de 81%. Spalding (2003) encontrou soropositividade para IgG em 74,5% e para IgM em 3,6% das 2126 gestantes que realizaram sorologia nas Unidades do Sistema Único de Saúde da região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Outro estudo realizado por Varela (2003) revelou uma prevalência de 59,8% em 1261 gestantes atendidas na Maternidade do Hospital Nossa Senhora da Conceição de Porto Alegre (RS).

Em Goiânia, a taxa de prevalência da infecção tem se mantido estável nos últimos 23 anos: Philocreon (1976) descreveu uma positividade sorológica de 63,45% entre gestantes e Avelino et al. (1999) mostraram 65,8% entre mulheres em idade procriativa.

Portanto, no Brasil, os diversos inquéritos epidemiológicos realizados em gestantes com diferentes testes sorológicos têm mostrado uma alta prevalência da toxoplasmose, que varia ao redor de 55% a 70%. Daí infere-se que de 30% a 45% das mulheres de idade fértil não apresentam anticorpos específicos para a doença com risco de contraí-la na gestação e transmiti-la ao concepto.

Considerando-se que a toxoplasmose congênita é sintomática em apenas 10% dos pacientes, torna-se muito difícil determinar sua real incidência em países que não realizam o acompanhamento sorológico sistemático durante a gestação (Hall 1992). Ela difere entre as várias populações, sendo estimada uma incidência de um a sete infectados para cada 1000 nascidos nas várias regiões do mundo. Em algumas localidades, essa taxa pode ser mais elevada, como 10,9/1000 encontrada na Guatemala

(Remington et al. 1995); 17/1000, em Brasília (Kaniak 1991) ou de 18/1000 no México (Sinibaldi & Ramirez 1992). Nos Estados Unidos da América varia de 0,5 a 1:1000 nascidos vivos (McCabe & Remington 1988), enquanto que em Paris é de 3:1000 nativos (Desmots et al. 1965). A incidência encontrada para mil nativos foi de 4,4 na Finlândia, de 5 na Austrália, de 7,5 na Alemanha e de 14,3 na Bélgica (Lappalainen et al. 1992).

Um estudo realizado por Avelino (1990), encontrou, entre 571 recém-nascidos, 9% com anticorpos da classe IgM e 18,2% com anticorpos da classe IgG, em títulos elevados, detectados por reação de Imunofluorescência Indireta.

Nas regiões de baixa prevalência da infecção pelo *T. gondii*, acredita-se que a toxoplasmose não constitui problema de saúde pública. Na Escandinávia, onde a toxoplasmose não é muito elevada, os programas pré-natais fazem a vigilância da gestante soronegativa ou de risco (Stray-Pedersen & Lorentzen-Styr 1979, Stray-Pedersen 1980; Stepick-Biek et al. 1990).

Na França, onde a prevalência da doença é elevada, também acontece a vigilância da gestante de risco no Serviço Público de Saúde. Com essa precaução durante toda a gravidez, a detecção precoce da doença aguda e início imediato da terapêutica, tem diminuído a transmissão da infecção ao feto (Wallon et al. 1994).

## **9. PROFILAXIA**

A prevenção da toxoplasmose congênita pode ser dividida em três categorias: primária, secundária e terciária. A prevenção primária caracteriza-se basicamente por programas de educação e saúde pública, recomendando às gestantes que evitem contato com materiais potencialmente contaminados com fezes de gatos e ingestão de carne

crua ou mal cozida não devendo ser colocado o dedo ou a mão na boca quando da preparação do alimento. As frutas e verduras devem ser bem lavadas antes do consumo. Os gatos domésticos devem ser alimentados preferentemente com ração e deve ser evitado contato com qualquer utensílio contaminado com fezes do animal. Além disso, enfatiza-se o uso de luvas ao manusear a terra ou a carne crua. Estas orientações, quando aplicadas no pré-natal, contribuem com a redução de 63% da primoinfecção na gravidez (Foulon 1992).

A prevenção secundária consiste em tentar evitar a transmissão transplacentária do parasita, através da identificação da mulher de risco pelo teste sorológico, da vigilância da soroconversão e do tratamento da gestante infectada, para diminuir a possibilidade de acometimento fetal (50% dos casos), com a espiramicina ou a pirimetamina e a sulfadiazina (Remington et al. 1995).

Um diagnóstico sorológico realizado na mulher em idade procriativa, identificando as soronegativas como de risco para adquirirem a infecção na gestação, seleciona aquelas que necessitam de vigilância pré-natal quanto à possibilidade de infecção aguda pelo *T. gondii*, mediante exames sorológicos seriados que permitam o diagnóstico da soroconversão. O diagnóstico de doença aguda na gestante permite a introdução precoce de uma terapêutica adequada, que pode impedir o aparecimento da infecção congênita (mais raramente) ou diminuir a incidência de formas graves na criança congenitamente afetada (Foullon et al. 1994).

A prevenção terciária, finalmente, concentra seus esforços em realizar um diagnóstico laboratorial e clínico precoce da toxoplasmose congênita no recém-nascido, permitindo a introdução de esquema terapêutico para prevenir ou minimizar os riscos de seqüelas (Hall 1992).

A instituição de programas educacionais para gestantes e imunossuprimidos

associada aos programas de triagem sorológica pré-natal pode reduzir de maneira significativa a transmissão e a ocorrência de formas graves da infecção pelo *T. gondii*. O rastreamento sorológico da toxoplasmose no pré-natal é obrigatório em poucos países, como na França e Áustria e mais recentemente em alguns estados brasileiros. Mas infelizmente, devido à falta de interesse dos governantes, esta triagem não está sendo realizada em muitos Estados. No Estado de Goiás, a partir de 2003, todas as gestantes tiveram incluído entre os exames do seu pré-natal, a pesquisa obrigatória da toxoplasmose, num programa conjunto da UFG com o SUS e APAE. Esse investimento busca reduzir as taxas de infecção congênita e as formas graves da doença com resultados sociais e econômicos positivos.

A eficácia de um programa preventivo, segundo Avelino (2000) depende de vários fatores:

- Do período gestacional em que a primeira amostra sorológica foi coletada;
- Do intervalo de tempo entre as sucessivas amostras sanguíneas;
- Do tempo de gestação da última amostra sanguínea. A soroconversão pode ocorrer no final da gravidez podendo ou não ser detectada no sangue do cordão umbilical do recém-nascido, porque os anticorpos produzidos pela mãe ou recém-nascido ainda não são detectáveis a nível laboratorial;
- Da cooperação entre as equipes multidisciplinares que trabalham com a mulher, incluindo profissionais de saúde, médicos generalistas, obstetras, especialistas em cordocentese, pediatras, oftalmologistas, fisioterapeutas, fonoaudiologistas, imunologistas e parasitologistas.

### **III - ARTIGO 1**

**DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA ATRAVÉS DA  
DETECÇÃO DE ANTICORPOS DA CLASSE IgM ANTI-*Toxoplasma gondii*  
PELAS TÉCNICAS MEIA E ELFA**

**Isolina Maria Xavier Rodrigues**

**RESUMO**

Nesse estudo realizou-se a sorologia para IgG e IgM anti-*T. gondii* no sangue do cordão de 1514 RN pela técnica MEIA e a comparação entre os resultados dos anticorpos IgG e IgM no sangue de cordão e periférico de 167 RN (86 suspeitos e 81 normais). A sorologia por MEIA permitiu que fossem selecionados 86 RN suspeitos de toxoplasmose congênita, cujas amostras foram testadas para detecção de IgM pela técnica ELFA. A comparação entre a sorologia para IgG e IgM por MEIA mostrou não haver diferença significativa entre os resultados obtidos no sangue de cordão e periférico. A triagem sorológica dos 1514 RN pela técnica MEIA revelou que: 0,59% (09/1514) apresentavam IgG e IgM reagentes; 64,60 (978/1514) apresentavam IgG reagente e IgM não reagente; 0,46% (7/1514) apresentavam IgG indeterminada e IgM não reagente e 34,35% (520/1514) apresentaram IgG e IgM não reagentes. A prevalência da toxoplasmose diagnosticada pela presença de IgM pelas técnicas MEIA e ELFA foi de 6,6/1000 nascimentos (10/1514), contudo não reflete o número de RN infectados, pois muitos RN não produzem anticorpos de classe IgM ao nascer, sendo necessário que os 76 RN suspeitos e que tiveram IgM não reagentes sejam acompanhados até dois anos de idade.

**ABSTRACT**

In that study took place the serology for IgG and IgM antitoxoplasma in the blood of the string of 1514 newborns for the technique MEIA and the comparison

among the results of the antibodies IgG and IgM in the string blood and outlying of 167 newborns (86 suspects and 81 normal). The serology for MEIA allowed 86 suspicious newborns of congenital toxoplasmosis to be selected, whose samples were tested for detection of IgM by the technique ELFA. The comparison among the serology for IgG and IgM for MEIA showed there not to be significant difference among the results obtained in the string blood and outlying. The screen serological of 1514 newborns for the technique MEIA revealed that: 0,59% (09/1514) they presented IgG and IgM reactives; 64,60 (978/1514) they presented IgG reactive and IgM no reactive; 0,46% (7/1514) they presented uncertain IgG and IgM no reactive and 34,35% (520/1514) they presented IgG and IgM no reactives. The incidence of the toxoplasmosis diagnosed by the presence of IgM by the techniques MEIA and ELFA it was of 6,6/1000 births (10/1514), however that incidence doesn't reflect the number of infected newborns, therefore many newborns don't produce class antibodies IgM when being born, being necessary that the 76 newborns suspects and that had IgM no reactives they are accompanied up to two years of age.

Palavras-chave: Toxoplasmose congênita, sorologia, MEIA, ELFA.

## 1. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório capaz de infectar uma grande variedade de hospedeiros intermediários incluindo o homem. A infecção do adulto normal é freqüentemente assintomática. Nos casos com manifestação clínica, o mais comum dos sinais é a linfadenopatia, que pode ser acompanhada de uma série de sintomas, dificultando o diagnóstico diferencial (Camargo 1995).

A toxoplasmose congênita é uma das formas mais graves da doença. A transmissão transplacentária do parasita pode ocorrer durante infecção aguda adquirida pela mãe durante a gestação ou pela reagudização da infecção materna. As



conseqüências da toxoplasmose para o feto dependem do grau de exposição aos agentes, da virulência da cepa e do período de gestação (Kauazoe 2002).

A grande maioria das crianças com toxoplasmose congênita têm doença subclínica ao nascer, podendo permanecer sem seqüelas de infecção ou desenvolverem retinocoroidite, estrabismo, retardo neuropsicomotor, hidrocefalia, convulsões e surdez, meses ou anos após o nascimento. A retinocoroidite é a mais freqüente, presente em aproximadamente 20% dos lactentes com diagnóstico sorológico pós-natal. Entretanto, o risco de aparecimento de novas lesões persiste por muitos anos, aumentando a incidência de retinocoroidite para até 85% dos casos, como demonstraram Koppe et al., acompanhando 11 lactentes com toxoplasmose congênita durante um período de 20 anos (in: Sáfadi 2000).

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose no recém-nascido (RN) pode ser feito por: isolamento do parasita em camundongos inoculados com sangue periférico ou líquido; cultura do parasita; Reação em Cadeia da Polimerase; detecção de antígenos ou anticorpos no líquido; detecção de anticorpos da classe IgM e/ou IgA no soro ou pela persistência de anticorpos da classe IgG após 12 meses de idade.

As técnicas sorológicas continuam sendo a maneira mais rápida e acessível para o diagnóstico da toxoplasmose congênita, embora não sejam as melhores. Essas técnicas foram aperfeiçoadas, nos últimos anos, pela necessidade de automatização dos testes, devido ao grande número de amostras analisadas em laboratórios e pela introdução de ensaios com maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Vários sistemas totalmente automatizados foram desenvolvidos, minimizando interferências nos resultados que podem ocorrer durante o preparo do reagente, na pipetagem de amostras e reagentes, nas lavagens e na leitura, que no caso da Imunofluorescência Indireta (IFI) é subjetiva, podendo sofrer interferência do observador.

As técnicas mais usadas são a MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) no sistema AxSYM desenvolvido pela Abbott (USA) e a ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) no sistema VIDAS da Bio-Merieux (França). O princípio de doseamento desses métodos é a associação da reação imunoenzimática com detecção final em fluorescência. A técnica ELFA é mais sensível e específica que a IFI, podendo diagnosticar, pelo achado da IgM, 80 a 90 % das crianças com toxoplasmose congênita (Camargo 2001). A técnica MEIA não foi testada em RN, por isso a sua sensibilidade e especificidade não é conhecida nesta população (Manual de Instruções Toxo-G e Toxo-M da Abbott).

No RN, essas técnicas podem auxiliar o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, pois a presença dos anticorpos da classe IgM é um dos critérios diagnósticos da infecção. Porém, quando pesquisados por IFI estão presentes apenas em 25% das infecções congênitas por ocasião do nascimento (Wong & Remington 1994). Espera-se que a utilização dessas técnicas, aumente a possibilidade de diagnosticar precocemente a toxoplasmose congênita, através da detecção de anticorpos da classe IgM.

O objetivo deste trabalho foi verificar se há diferença significativa entre os resultados de IgG e IgM, por MEIA, obtidos do sangue de cordão e sangue periférico de RN e determinar a prevalência da toxoplasmose congênita diagnosticada pela presença de anticorpos da classe IgM anti-*T. gondii*, usando as técnicas MEIA e ELFA.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Estudo prospectivo realizado numa coorte de RN da Maternidade do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, referência no Estado para gestações de risco e transmissão vertical de infecções maternas. O período de estudo ficou compreendido entre primeiro de janeiro de 2004 a trinta de setembro de 2005. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Goiás, sendo necessária a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido por todas as mães de RN incluídos na investigação. A casuística compreendeu 1514 RN que realizaram sorologia para detecção de anticorpos das classes IgG e IgM anti-*T. gondii* durante o período de realização da pesquisa.

Para realização da sorologia, foi colhido 5 ml de sangue do cordão umbilical, no momento do nascimento, colocado em um tubo sem anticoagulante e enviado à seção de Imunologia do Laboratório de Análises Clínicas do HC. O sangue foi centrifugado a 2500 rpm e o soro obtido foi armazenado em um tubo de ensaio para realização da sorologia. As reações foram realizadas no máximo dois dias após a coleta.

A detecção dos anticorpos das classes IgG e IgM anti-*T. gondii* foi realizada com equipamento totalmente automatizado AxSYM da Abbott. A metodologia usada nesse sistema é a MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay). Considerou-se IgG reigente quando a concentração foi  $> 3$  UI/ml, e IgG não reigente, quando a dosagem destes anticorpos foi  $< 2$  UI/ml. A dosagem de IgM foi considerada reigente, quando o índice foi  $> 0,600$  UI/ml, e não reigente, quando  $< 0,500$  UI/ml. Os valores intermediários entre 2 e 3 UI/ml para concentração de IgG, e entre 0,500 e 0,599 para IgM, foram considerados duvidosos (Manual de Instruções Toxo-G e Toxo-M da Abbott).

A sorologia do sangue do cordão dos 1514 RN permitiu que fossem selecionados 86 RN suspeitos de toxoplasmose congênita, de acordo com o protocolo estabelecido pelo programa preventivo contra toxoplasmose congênita da Suíça (Berger et al. 1992), assim distribuídos:

- nove infectados - identificados por apresentarem anticorpos da classe IgM anti *T.gondii* reagentes ao nascimento. Os resultados foram confirmados com nova amostra de sangue coletada entre 10 a 15 dias de vida;
- cinquenta provavelmente infectados - por serem filhos de mulheres que contraíram a toxoplasmose durante a gestação, mas não apresentaram IgM. Em 26 foi encontrada uma concentração de IgG  $< 200$  UI/ml e em 24 as concentrações eram  $> 200$  UI/ml;
- 27 com possível infecção – por apresentarem concentração de IgG  $> 200$  UI/ml ao nascimento e história materna não conclusiva sobre provável soroconversão durante a gestação.

As amostras selecionadas foram analisadas pela técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) no sistema VIDAS da Bio-Merieux. Os valores de referência usados nesta técnica foram: se IgM foi  $< 0,55$ UI/ml, o resultado foi considerado não reagente; se  $\geq 0,55$  e  $< 0,65$  UI/ml foi indeterminado e se  $\geq 0,65$  foi reagente (Manual de Instruções Toxo-M da Bio-Merieux). O Laboratório do Hospital das Clínicas não dispõe de equipamento e reagentes para realização da técnica ELFA, tendo sido necessário enviar as amostras a um laboratório da rede particular, com reconhecido padrão de qualidade.

Os RN que apresentaram resultado de IgM reagente por MEIA e/ou ELFA foram submetidos a coleta de sangue 15 dias após o nascimento para confirmar os resultados. Nos casos em que houve discrepância entre os resultados obtidos pelas duas

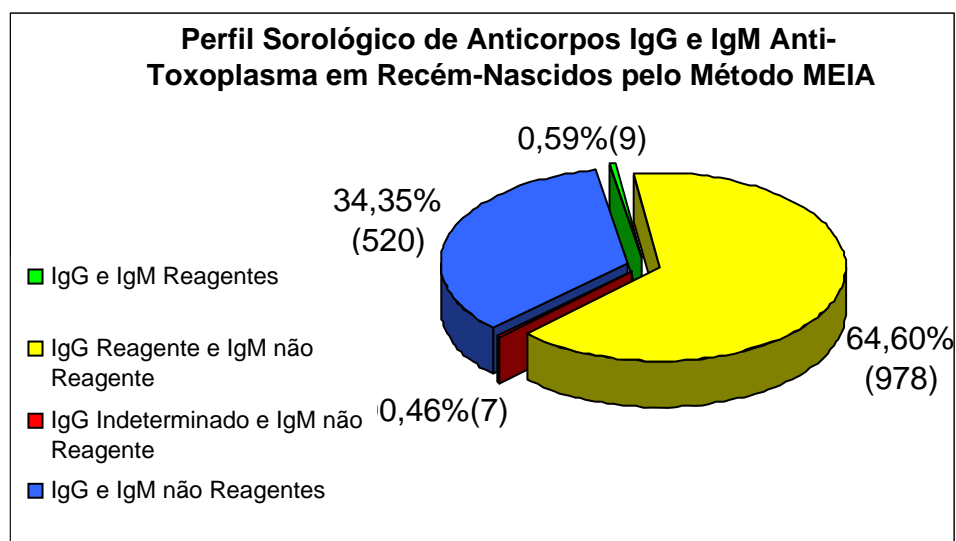
técnicas, foi realizada a IFI para IgM anti-*T. gondii* e a reação de ELISA duplo sanduíche para detecção de IgA específica. Essas reações foram realizadas pelo mesmo Laboratório que executou a técnica ELFA.

Durante a realização da pesquisa, foi feita a comparação entre a sorologia para IgG e IgM por MEIA no sangue de cordão umbilical e sangue periférico de 167 RN, a fim de verificar se havia diferença significativa entre os resultados obtidos dessas duas amostras. Desses, 86 foram selecionados por serem suspeitos de toxoplasmose congênita e 81 por serem normais. O sangue periférico foi colhido no mesmo dia ou um dia após o nascimento dessas crianças e os resultados obtidos no sangue de cordão e sangue periférico foram comparados estatisticamente usando o Teste *t* de Student para amostras pareadas.

### 3. RESULTADOS

A comparação entre a sorologia no sangue de cordão e sangue periférico dos 167 RN, através do Teste *t* de Student para amostras pareadas ( $t_{calc} = 0,54$ ,  $t_{0,05;166} = 1,96$  teste bilateral), permitiu afirmar, com 95% de confiança, que não houve diferença significativa ao se comparar as quantidades médias de IgG do sangue do cordão umbilical e do sangue periférico e como o  $t_{calc} = 0,15$ ,  $t_{0,05;166} = 1,96$ , pode-se também afirmar, com 95% de confiança, que não houve diferença significativa ao se comparar as quantidades médias de IgM do sangue do cordão umbilical e do sangue periférico. Ambos os resultados significam que para efeito de exame de detecção, pela técnica MEIA, tanto faz utilizar o sangue do cordão quanto o sangue periférico para realizar a sorologia para IgG e IgM anti-toxoplasma.

O gráfico abaixo mostra os resultados dos anticorpos da classe IgG e IgM, por MEIA, obtidos no sangue de cordão dos 1514 RN:



Dos 86 RN suspeitos que realizaram sorologia pela técnica MEIA e ELFA, 11,63%(10/86) apresentaram IgM reagente e 88,37%(76/86) apresentaram IgM não reagente. Os resultados de IgM reagentes por MEIA e/ou ELFA foram confirmados nas amostras de sangue colhidas 15 dias após o nascimento. Entre os dez RN que apresentaram IgM reagente, oito foram reagentes por MEIA e ELFA, um foi reagente apenas por ELFA e um foi reagente apenas por MEIA. Tanto a técnica MEIA, quanto a ELFA detectaram IgM em 10,47% (9/86) das amostras dos RN examinados.

O lactente que apresentou IgM reagente apenas por MEIA e o que apresentou IgM reagente apenas por ELFA eram filhos de mães com diagnóstico de toxoplasmose aguda durante a gravidez. O RN, cujo resultado de IgM por MEIA foi reagente (2,248 UI/ml), teve resultado confirmado pela IFI, com título de 1/160, e por IgA no valor de 95,4 UI/ml. O RN com IgM por ELFA reagente (1,4 UI/ml) apresentou IFI não reagente e IgA reagente (54,6 UI/ml). Não ocorreram reações falsamente positivas por essas

técnicas, pois a infecção congênita foi confirmada nos dez RN que apresentaram IgM reagente.

#### **4. DISCUSSÃO**

O resultado obtido da comparação entre a sorologia no sangue de cordão e sangue periférico mostrou que o sangue de cordão pode ser usado para a realização da sorologia, uma vez que a punção do sangue periférico é difícil, causando muito desconforto para o RN, principalmente quando esse é de baixo peso (<2500g). Além do mais o volume de soro possível de ser colhido pode não ser suficiente para realização da sorologia por técnicas automatizadas (MEIA e ELFA).

Os resultados obtidos por MEIA permitiram traçar o perfil sorológico dos RN da Maternidade do Hospital das Clínicas da UFG e o perfil sorológico das mães destas crianças, uma vez que o resultado da sorologia do filho, quando este não está infectado, é praticamente igual ao da sorologia da mãe, no tocante a IgG. Tendo como base a frequência de IgG nos RN, pode-se afirmar que, das gestantes que deram a luz na Maternidade, 65,19% tiveram contato com o *T. gondii* e 34,35% não tiveram contato, confirmando dados já descritos na literatura para a mesma região geográfica (Avelino et al. 1999).

A prevalência da toxoplasmose congênita, com base na presença de IgM por MEIA e/ou ELFA na população estudada foi de 6,6 casos em 1000 nascimentos. Embora essa frequência seja muito superior à descrita por alguns pesquisadores (de 0,2 a 2 casos em 1000 nascimentos - Williams et al. 1981), não reflete a frequência de infectados, pois dentre os 86 RN que apresentaram suspeita de transmissão vertical,

apenas 11,63% (10) tiveram diagnóstico confirmado nos 15 primeiros dias de vida pela presença de IgM anti-*T. gondii*.

Os demais RN, 88,37% (76/86), cujo diagnóstico não pode ser concluído, pois não apresentaram IgM no sangue ao nascer, foram submetidos a outros exames disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), como sorologia do líquido cefalorraquidiano (LCR), inoculação de sangue ou de LCR em camundongos isogênicos, exame ultrassonográfico de crânio, exame de fundo de olho e acompanhamento sorológico até os dois anos de idade, com vistas a se confirmar ou excluir o diagnóstico da toxoplasmose congênita.

Nos casos de comprometimento meningoencefálico, geralmente assintomático, a presença de anticorpos da classe IgG e/ou IgM no LCR, é diagnóstica de transmissão vertical (por produção local do anticorpo ou lesão da barreira hematoencefálica). Como o comprometimento meningoencefálico geralmente se faz presente em 60% dos casos (Boyer et al. 1998), ainda fica um percentual importante de crianças (40%) que nascem assintomáticas e necessitam ser acompanhadas e tratadas, talvez de forma desnecessária. Isso poderia ser resolvido com a utilização dentro da rotina do SUS, da PCR, um exame que permite o diagnóstico de certeza da transmissão congênita. Contudo, no momento, a sorologia está sendo o recurso diagnóstico mais rápido e acessível à população de baixa renda, pois a inoculação em camundongo encontra-se em fase de padronização, o que torna o seu resultado muito demorado (até seis meses).

Não foi possível comparar a prevalência da toxoplasmose congênita encontrada nos RN da Maternidade do Hospital das Clínicas com a prevalência dessa doença em RN de outras regiões. Isso se deve ao fato dessa Maternidade ser referência para o diagnóstico e tratamento da toxoplasmose congênita no município de Goiânia e Estado de Goiás. Para essa Maternidade são encaminhadas as gestantes que tiveram diagnóstico



de toxoplasmose aguda durante a gravidez, fato este que aumenta a incidência da toxoplasmose congênita na população estudada.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avelino MM, Parada JCB, Castro AM. Distribuição sócio-geográfica da toxoplasmose. Rev Brasil Ginecol Obstet, 1999, 1:72. Suplemento 1.
2. Boyer KM, Remington JS, MacLeod RL. Toxoplasmosis. In: Feigin and Cherry. Textbook of Pediatric Infectious Diseases Philadelphia: WB Saunders Company; 1998, 2473-490.
3. Camargo ME. Alguns aspectos atuais do diagnóstico da toxoplasmose. Anales de la Real Academia Nacional de Medicina, 1995, 155: 236-39.
4. Camargo ME. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, eds. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001; 278-286.
5. Kauzoe U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. Parasitologia Humana. 10. ed. São Paulo: Atheneu; 2002; 149-56.
6. Manual de Instruções de Uso do Sistema AXSYM Toxo IgG e IgM, produzido por Abbott Laboratories – Estados Unidos, 2000.
7. Manual de Instruções de Uso do Sistema VIDAS Toxo IgM, produzido por Bio-Merieux, s. a.; França, 1998.
8. Sáfadi, MAP. Toxoplasmose. Pediatria Moderna, vol. 36, n. 1/2, p.9-19, 2000.

9. Williams KAB, Scott JM, McFarlane DE, Williams JM, Eliasjones, TF, Willians H. Congenital toxoplasmosis: a prospective survey in the west of Scotland. *The Journal of Infection*, 1981, 3:219-229.
10. Wong SY & Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infectious Diseases*, 1994, 18: 853-62.

## **IV - ARTIGO 2**

**DIAGNÓSTICO PÓS-NATAL DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA:  
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS DAS  
CLASSES IgM e IgA ANTI-*Toxoplasma gondii***

**Isolina Maria Xavier Rodrigues**

**RESUMO**

Estudo sorológico realizado numa coorte de 56 crianças suspeitos de toxoplasmose congênita. As amostras dessas crianças foram testadas para IgM anti *T.gondii* pelas técnicas MEIA, ELFA e IFI e para IgA por ELISA captura. O diagnóstico da infecção congênita foi concluído em 44 crianças, sendo que 28 estavam infectados e 16 não estavam. A sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos positivo e negativo das técnicas MEIA e ELFA foram iguais, respectivamente de 36,7%, 100%, 100%, 47,1% e 59,1%; da IFI 28,6%, 87,5%, 80,0%, 44,4% e 50% e da IgA de 25,0%, 100%, 100%, 43,2% e 52,3%. A IgM foi reagente em 81,8% (9/11) das crianças sintomáticas, demonstrando sua relação com a gravidade da transmissão vertical, com maiores concentrações em crianças mais afetadas pelo processo infeccioso intra-uterino. Por outro lado, não foi detectada em 57,1% (16/28) dos infectados, provavelmente em consequência do tratamento da mãe. A sensibilidade da IgM anti *T.gondii*, associando três técnicas (MEIA, ELFA e IFI) foi de 42,9% (12/28) e da IgA foi de 25% (7/28), mostrando que a suspeita de toxoplasmose congênita não pode ser afastada apenas pela ausência desses anticorpos.

**ABSTRACT**

Study serological accomplished in a cohort of 56 suspicious children of congenital toxoplasmosis. Those children's samples were tested for IgM anti *T. gondii* for the techniques MEIA, ELFA and IFI and for IgA for ELISA captures. The diagnosis

of the congenital infection was concluded in 44 children, and 28 were infected and 16 were not. The sensibility, especificity, accurate, values positive and negative preditivos of the techniques MEIA and ELFA were same, respectively of 36,7%, 100%, 100%, 47,1% and 59,1%; of IFI 28,6%, 87,5%, 80,0%, 44,4% and 50% and of IgA of 25,0%, 100%, 100%, 43,2% and 52,3%. IgM was reactive in 81,8% (9/11) of the symptomatic children, demonstrating your relationship with the gravity of the vertical transmission, with larger concentrations in more affected children for the intrauterine infectious process. On the other hand, it was not detected in 57,1% (16/28) of those infected, probably in consequence of the mother's treatment. The sensibility of the IgM anti *T. gondii*, associating three techniques (MEIA, ELFA and IFI) it was of 42,9% (12/28) and of IgA it was of 25% (7/28), showing that the suspicion of congenital toxoplasmosis cannot just be moved away by the absence of those antibodies.

**Palavras-chave:** Toxoplasmose congênita, MEIA, ELFA, IFI, ELISA captura.

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção materna primária causada pelo *Toxoplasma gondii* adquirida durante a gestação é de elevada importância pelo risco de resultar em infecção fetal com graves seqüelas para a criança. Aproximadamente 40% das gestantes, se não tratadas, transmitirão a toxoplasmose para seus filhos, sendo que a incidência de infecção fetal é maior quando essa é adquirida no terceiro trimestre (59%), e a gravidade é maior quando a infecção materna é adquirida no primeiro trimestre, apesar do menor risco de transmissão (14%). O risco de infecção fetal e a gravidade são intermediários no segundo trimestre (29%). A incidência da toxoplasmose congênita é variável, ocorrendo em 1:1000 a 1:12000 nascimentos (Guerina et al. 1994).

O diagnóstico precoce da toxoplasmose, assim como o tratamento antiparasitário adequado da gestante, tem demonstrado ser capaz de reduzir a taxa de transmissão para

o feto e por consequência o número de seqüelas nos casos em que a infecção intra-uterina já ocorreu. Todas as gestantes suscetíveis (com sorologia negativa) à infecção devem ser acompanhadas com testes sorológicos ao longo da gestação e informadas sobre os riscos para adquirir a infecção.

O espectro clínico da infecção congênita pelo *T. gondii* varia de alterações aparentes ao nascimento, com morbimortalidade perinatal elevada (microcefalia, crescimento intra-uterino retardado, hidrocefalia), a uma infecção subclínica com risco para o desenvolvimento de coriorretinite e/ou complicações tardias (Roizen et al. 1995).

A fim de providenciar tratamento apropriado para todas as crianças com risco de embriopatia pelo *T. gondii*, o diagnóstico definitivo da infecção congênita é obrigatório e deve ser prontamente realizado. Esse diagnóstico tem se baseado, principalmente, na realização de testes sorológicos que evidenciem a presença, no soro do recém-nascido (RN) ou do lactente, de duas classes de imunoglobulina (Ig) que não atravessam a barreira placentária: a IgM ou a IgA anti-toxoplasma.

A pesquisa de anticorpos IgA anti-*T. gondii* tem sido recomendada para diagnóstico da infecção neonatal, como tão ou mais sensível do que a de anticorpos IgM (Stepick-Biek et al. 1990). A presença da IgG específica, por outro lado, pode representar apenas transmissão de anticorpos maternos, que desaparecem no decorrer do primeiro ano de vida. Nos casos em que não foi possível detectar a presença da IgM ou da IgA específica no soro do lactente com suspeita de infecção congênita, uma curva ascendente de IgG anti-toxoplasma ou a permanência destes anticorpos por mais de doze meses pode fornecer a confirmação diagnóstica.

Há inúmeras dificuldades para fazer o diagnóstico da toxoplasmose congênita, pois cerca de 80 % dos RN são assintomáticos ao nascer, podendo permanecer durante anos sem nenhuma manifestação da doença, o que não impede o aparecimento de lesões

posteriores, principalmente oculares e cerebrais, podendo levar à cegueira e ao retardo mental (Caiaffa et al. 1993). Assim, existe uma necessidade de se encontrar métodos sorológicos que sejam sensíveis e específicos para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, situação que motivou a realização desse estudo.

Para aumentar a sensibilidade da detecção dos anticorpos da classe IgM anti-toxoplasma nos RN com suspeita de infecção congênita, foram associadas três técnicas sorológicas, sendo duas automatizadas - MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) e ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)- e uma manual (Imunofluorescência Indireta) com o objetivo de se verificar qual das três é mais sensível e específica. A IgA específica anti-toxoplasma também foi testada nas amostras dos RN suspeitos para verificar se essa imunoglobulina é mais sensível e específica que a IgM anti-toxoplasma.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Esse estudo foi aninhado a uma coorte de RN suspeitos de toxoplasmose congênita, realizado na Maternidade do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Goiás, no período de primeiro de janeiro de 2004 a trinta de setembro de 2005. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, tendo sido colhida a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido de todas as mães dos RN incluídos na investigação.

A Maternidade do Hospital das Clínicas é referência para o diagnóstico e tratamento de RN com suspeita de toxoplasmose. Para ela são encaminhadas as gestantes com diagnóstico de toxoplasmose aguda durante a gestação, realizado nas Unidades de Saúde do município de Goiânia e Estado de Goiás.

Foi realizado o screening sorológico no sangue de cordão umbilical de 1514 RN, como rotina do serviço de Neonatologia do HC. Utilizou-se a técnica MEIA no equipamento automatizado AxSYM da Abbott, para detecção de anticorpos das classes IgG e IgM anti-toxoplasma. Os valores de referência utilizados para IgG foram: > 3 UI/ml foram considerados como reagentes; entre 2 e 3 UI/ml, duvidosos e < 2 UI/ml não reagentes. Para IgM foram considerados > 0,600 UI/ml como reagentes; entre 0,500 e 0,600 UI/ml como duvidosos e < 0,500 UI/ml como não reagentes. Isso permitiu que fossem selecionados 86 RN suspeitos de toxoplasmose congênita de acordo com o protocolo estabelecido pelo programa preventivo contra toxoplasmose congênita da Suíça (Berger et al. 1992), assim distribuídos:

- Nove infectados - identificados por apresentarem anticorpos da classe IgM anti-*T.gondii* reagentes ao nascimento, confirmados com nova amostra de sangue coletada entre 10 a 15 dias de vida;
- Cinquenta provavelmente infectados - por serem filhos de mulheres que contraíram a toxoplasmose durante a gestação, mas não apresentaram IgM ao nascer. Em 26 foi encontrada uma concentração de IgG < 200 UI/ml e em 24 as concentrações eram > 200 UI/ml;
- 27 com possível infecção – por apresentarem concentração de IgG > 200 UI/ml ao nascimento, e história materna não conclusiva sobre provável soroconversão na gestação.

As amostras de sangue desses 86 RN foram enviadas a outro laboratório, com reconhecido padrão de qualidade, para que fosse realizada a detecção de IgM anti-toxoplasma pela técnica ELFA no equipamento VIDAS da Bio-Merieux. Os valores de referência usados foram: se IgM < 0,55UI/ml, o resultado foi considerado não reagente; se  $\geq 0,55$  e < 0,65 UI/ml foi indeterminado e se  $\geq 0,65$  UI/ml foi reagente (Manual de



Instruções Toxo-M da bio-Merieux). Para afastar uma possível reação cruzada entre os anticorpos da classe IgM anti-*T. gondii* e anti -Citomegalovírus, rubéola e/ou vírus Epstein Barr, realizou-se a sorologia para esses vírus nas amostras com IgM reagente. Para rubéola e citomegalovírus utilizou-se MEIA e a para mononucleose, aglutinação indireta.

Como critérios de inclusão no estudo foram considerados: aceitação para a realização da pesquisa pela mãe; acompanhamento no Ambulatório de Infecções Congênicas do Hospital das Clínicas; conclusão final da presença ou ausência de transmissão vertical. Os critérios de exclusão foram: falta de retorno ao serviço, diagnóstico da toxoplasmose inconclusivo.

Dos 86 suspeitos de infecção congênita, 56 retornaram ao serviço. As amostras de sangue dessas 56 crianças que haviam sido testadas pelas técnicas MEIA e ELFA e que estavam congeladas a -20°C, foram enviadas a outro laboratório para que fosse realizada a detecção de IgA específica pela técnica de ELISA duplo sanduíche (captura) e a detecção de IgM anti *T.gondii* através da reação de Imunofluorescência Indireta (IFI). Os valores de referência da IgM por IFI foram: menor que 1/10 não reagente e maior ou igual a 1/10 reagente. Os valores de referência usados na interpretação dos resultados da IgA específica foram: IgA menor que 4,5 UA/ml, não reagente; IgA entre 4,5 e 5 UA/ml, duvidoso; IgA maior que 5 UA/ml, reagente.

Durante o acompanhamento das crianças, realizou-se sorologia para detecção de IgG e IgM por MEIA a cada dois meses, ou de acordo com solicitação do médico responsável, até 12 meses de idade. A sorologia por ELFA-IgM, IFI-IgM e ELISA-IgA foi realizada nas amostras com resultado de IgM reagente por MEIA.

As técnicas sorológicas para detecção da IgM específica foram escolhidas com base nos seguintes critérios:

- 1- A técnica MEIA é disponível no Laboratório do HC para fazer a triagem sorológica dos RN;
- 2- Tanto MEIA quanto ELFA são totalmente automatizadas, portanto, livres de interferências que ocorrem nas técnicas manuais;
- 3- A técnica ELFA realiza a imunocaptura dos anticorpos da classe IgM, evitando reações falso positivas (devido à presença do fator reumatóide) e falso negativas (devido ao excesso de IgG) e possui sensibilidade e especificidade comparáveis ao teste ISAGA , de 93,5% e 99,3% respectivamente;
- 4- A IFI é a mais usada, de menor custo e mais acessível para a maioria da população.

Como medida terapêutica precoce, visando a profilaxia das lesões oculares e/ou cerebrais, essas crianças foram submetidas ao tratamento com sulfadiazina (100 mg/kg/dia) associado à pirimetamina (1 mg/kg/dia) e ao ácido fólico (3 mg/dia) desde o nascimento até que o diagnóstico de toxoplasmose pudesse ser afirmado através de estagnação ou ascensão dos títulos de IgG durante o desenvolvimento da criança, ou com resultados de outros exames complementares (ultrassonografia de crânio transfontanela, fundo de olho, cultura e inoculação em camundongo e exame de líquido cefalorraquidiano).

Determinou-se a sensibilidade (**s**), especificidade (**e**), acurácia (**Ac**), valores preditivo negativo (**VPN**) e positivo (**VPP**) dos anticorpos da classe IgM por MEIA, ELFA e IFI e dos anticorpos IgA por ELISA captura no diagnóstico da toxoplasmose congênita, usando as fórmulas matemáticas de Thomas Bayes (Kawamura 2002):

$$s = \frac{VP}{(VP + FN)};$$

$$e = \frac{VN}{(VN + FP)};$$

$$\mathbf{VPP} = \mathbf{VP} / (\mathbf{VP} + \mathbf{FP});$$

$$\mathbf{VPN} = \mathbf{VN} / (\mathbf{VN} + \mathbf{FN});$$

$$\mathbf{Ac} = (\mathbf{VP} + \mathbf{VN}) / \mathbf{n}.$$

**VP** -verdadeiro positivo, **VN** -verdadeiro negativo, **FP** -falso positivo, **FN** -falso negativo e **n** -número de amostras.

### 3. RESULTADOS

No período do estudo, foi possível concluir, clinicamente e laboratorialmente, o diagnóstico da presença ou ausência da toxoplasmose congênita em 44 crianças, sendo que em 12 não foi possível concluí-lo por falta de resultados suficientes e por essas crianças serem assintomáticas. Os critérios usados pelo médico para diagnosticar a toxoplasmose congênita foram:

- 1- Presença de IgM e/ou IgA anti-toxoplasma em qualquer concentração, uma vez que não atravessam a barreira placentária e/ou;
- 2- IgG elevada no sangue do cordão ou periférico, associada a alterações clínicas compatíveis com toxoplasmose congênita tais como: febre, icterícia, alterações no volume craniano (microcefalia ou hidrocefalia), convulsões, coriorretinite, calcificações cerebrais, anemia, miocardite, hepatoesplenomegalia, retardo neuropsicomotor, alterações auditivas e/ou;
- 3- Anormalidades no líquido cefalorraquidiano (bioquímica, celularidade e/ou presença de IgG ou IgM anti-toxoplasma) associado ou não a qualquer um dos sintomas citados e/ou;

- 4- Aumento da concentração dos anticorpos da classe IgG ou manutenção de níveis elevados por mais de três meses, com aparecimento ou não de manifestações clínicas sugestivas da infecção e/ou;
- 5- Presença de IgG em títulos maiores do que os da mãe, em no mínimo quatro diluições, pela técnica de IFI e/ou;
- 6- Identificação do *T. gondii* por inoculação em camundongos isogênicos.

Das 44 crianças, cujo diagnóstico da toxoplasmose pode ser concluído, 28 estavam infectadas pelo *T. gondii* e 16 não estavam. Nas 16 crianças não infectadas, a sorologia para os anticorpos da classe IgG negativou-se entre o quarto e o décimo mês de vida (com confirmação da negativação após suspensão do tratamento), o exame do líquido foi normal com sorologia negativa, a ultra-sonografia de crânio e o exame de fundo de olho foram normais, apresentando desenvolvimento neuropsicomotor normal ao final de um ano de vida.

A toxoplasmose congênita pôde ser diagnosticada laboratorialmente em 11 das 28 crianças infectadas, nos primeiros 15 dias de vida, pela presença de anticorpos da classe IgM anti-toxoplasma no soro obtido do sangue de cordão e no sangue periférico, colhido de dez a 15 dias após o nascimento. A tabela I mostra os resultados dos anticorpos da classe IgM e IgA anti-*T. gondii* obtidos das amostras dessas 11 crianças:

TABELA I

**Perfil sorológico dos anticorpos das classes IgM e IgA Anti-*Toxoplasma gondii* em Recém-Nascidos com Toxoplasmose Congênita da Maternidade do Hospital das Clínicas de Goiânia (GO), Brasil, 2005.**

Recém-nascidos	MEIA-M (UI/ml)	ELFA-M (UI/ml)	IFI-M	IgA (UI/ml)
Caso 1	0,348 (NR)	1,4 (R)	<1/10 (NR)	54,6 (R)
Caso 2	9,203 (R)	10,6 (R)	1/320 (R)	89,8 (R)
Caso 3	0,849 (R)	1,2 (R)	1/40 (R)	2,5 (NR)
Caso 4	1,742 (R)	2,9 (R)	<1/10 (NR)	1,8 (NR)
Caso 5	6,432 (R)	8,4 (R)	1/640 (R)	61,5 (R)
Caso 6	1,450 (R)	1,9 (R)	<1/10 (NR)	3,2 (NR)
Caso 7	1,946 (R)	2,6 (R)	1/80 (R)	72,4 (R)
Caso 8	2,248 (R)	0,2 (NR)	1/160 (R)	95,4 (R)
Caso 9	1,824 (R)	3,2 (R)	1/160 (R)	2,1 (NR)
Caso 10	14,248 (R)	12,5 (R)	1/1280 (R)	110,4 (R)
Caso 11	0,342 (NR)	0,2 (NR)	1/256 (R)	2,4 (NR)

R - reagente; NR - não reagente.

Um RN sintomático que apresentou IgM e IgA não reagente com 27 dias, positivou-os com dois meses de vida (pelas quatro técnicas), possibilitando o diagnóstico da toxoplasmose congênita. Portanto das 28 crianças infectadas 12 tiveram anticorpos da classe IgA e/ou IgM reagentes e 16 não apresentaram esses anticorpos. A infecção nas 16 crianças que não apresentaram IgM e/ou IgA foi confirmada pelos critérios de diagnóstico da toxoplasmose congênita descritos anteriormente.

A sorologia para Citomegalovírus, Rubéola, Sífilis e Mononucleose realizada nas amostras que tiveram IgM reagente anti-toxoplasma foi não reagente, demonstrando que não houve reação cruzada com os anticorpos dessas patologias.

A tabela II mostra a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia dos testes utilizados.

**TABELA II**

**Determinação da Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo e Acurácia das reações sorológicas utilizadas no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, Goiânia (GO), Brasil, 2005.**

<b>Técnicas</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Valor Preditivo Positivo</b>	<b>Valor Preditivo Negativo</b>	<b>Acurácia</b>
<b>MEIA-IgM</b>	35,7%	100%	100%	47,1%	59,1%
<b>ELFA-IgM</b>	35,7%	100%	100%	47,1%	59,1%
<b>IFI-IgM</b>	28,6%	87,5%	80%	44,4%	50%
<b>ELISA-IgA</b>	25,0%	100%	100	43,2%	52,3%

#### **4. DISCUSSÃO**

A especificidade das técnicas MEIA e ELFA foi de 100%, pois todas as crianças sem a doença não apresentaram anticorpos da classe IgM anti-toxoplasma e a sensibilidade foi de 35,7%, pois apenas dez dos 28 infectados apresentaram anticorpos da classe IgM por essas técnicas. A especificidade da IFI foi de 87,5%, pois duas crianças entre as 16 não infectadas apresentaram resultados de IgM falsamente positivos

e a sensibilidade foi de 28,6%, pois apenas oito das 28 infectadas tiveram IgM reagente por essa técnica.

A técnica MEIA, mesmo não sendo um teste de captura, apresentou sensibilidade e especificidade comparável à técnica ELFA na detecção de anticorpos da classe IgM anti-toxoplasma, o que a torna mais indicada, por ser de menor custo e igual eficácia.

A sensibilidade da identificação da IgM anti-*T. gondii*, mesmo associando três técnicas sorológicas (MEIA, ELFA e IFI), foi de apenas 42,9%(12/28). Isso é muito preocupante, pois em muitos centros a detecção desse anticorpo no “teste do pezinho” é o único exame realizado para se fazer o diagnóstico da toxoplasmose congênita.

A IgA específica contra o *T.gondii* foi reagente em 25% (7/28) das crianças infectadas, apresentando uma sensibilidade de 25% no diagnóstico da toxoplasmose congênita e especificidade de 100%, uma vez que não ocorreram resultados falsamente positivos. Essa baixa sensibilidade pode ser devida à técnica usada (ELISA, duplo sanduíche) e/ou ao tratamento das gestantes (Pinon et al. 1996).

A IgM anti *T.gondii* não foi detectada em 57,1%(16) das crianças com toxoplasmose congênita. Isso pode ter ocorrido devido à diminuição da parasitemia em consequência do tratamento da mãe, conforme demonstrado em estudo realizado por Pinon et al. (1996), mostrando que o tratamento da gestante com toxoplasmose diminuiu consideravelmente a resposta imunológica do feto e RN, impedindo ou diminuindo a produção de anticorpos da classe IgM e IgA, em consequência da redução significativa dos antígenos circulantes do *T. gondii*.

Somente 39,3% (11/28) das crianças com toxoplasmose congênita apresentaram sintomas da doença, sendo que, em apenas duas (18,2%) não foram detectados os anticorpos da classe IgM.

Existe consenso entre alguns autores (Borobio et al. 1980; Serra et al. 1982; Srinivasan et al. 1983), com relação à Sífilis congênita, de que os níveis de IgM estão elevados nas crianças sintomáticas, podendo, na maioria das vezes, estarem normais ou com níveis baixos em crianças assintomáticas (Horwitz 1980). Acreditamos que o mesmo pode ocorrer na toxoplasmose, pois, em nosso estudo, 81,8% (9/11) das crianças sintomáticas apresentavam anticorpos da classe IgM anti-toxoplasma reagentes. Verificou-se, também, que os sintomas foram mais graves nos três RN que apresentaram as maiores concentrações de IgM e cujas mães não foram tratadas (caso 2, 5 e 10).

Ao se comparar o percentual de crianças infectadas que apresentaram IgG < 200 UI/ml (20,0% ou 4/20) com o percentual de infectadas com IgG >200 UI/ml (66,7% ou 13/19), verificou-se que a ocorrência da toxoplasmose congênita foi maior nos RN que apresentaram maiores concentrações de IgG, em consonância com a pesquisa realizada por Avelino (1999) que considerou como suspeitos de estarem infectados os RN com IgG maior que 1/4096 por IFI e maior 1,5 por ELISA, diagnosticando a toxoplasmose em 35,4% de 65 crianças que apresentavam os anticorpos da classe IgG nessas concentrações.

Ressaltamos que a suspeita da toxoplasmose congênita não pode ser afastada apenas pela ausência de anticorpos da classe IgM e IgA ou pela negatificação dos anticorpos da classe IgG, principalmente naquelas crianças tratadas seja na fase intra-uterina e/ou pós-natal. O acompanhamento do lactente com suspeita de toxoplasmose congênita deve ser feito em serviços especializados, usando todos os recursos diagnósticos possíveis e disponíveis, a fim de que nenhuma criança sofra as conseqüências da toxoplasmose em decorrência da imperícia de um clínico que venha a



afastar a possibilidade dessa infecção congênita com base, apenas, nos resultados dos testes sorológicos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avelino MM, Gilbert LDP, Garcia-Zapata MTA. Proposta de um cut-off para IgG como marcador da toxoplasmose congênita. *Rev Brasil Ginecol Obstet*, v. 1, p. 73, 1999. Suplementum 1.
2. Berger R, Sturchler D, Rudin C. Cord blood screening for congenital toxoplasmosis: detection and treatment of asymptomatic newborns in Basel, Switzerland. *Scan J Infect Dis Estocolmo* 1992; 84:46-50.
3. Berger R, Sturchler D, Rudin C. Cord blood screening for congenital toxoplasmosis: detection and treatment of asymptomatic newborns in Basel, Switzerland. *Scan J Infect Dis Estocolmo* 1992; 84:46-50
4. Borobio MV Nogales MC & Palomares SC. Value of serological diagnosis in congenital syphilis. *Brit. J. vener. Dis* 1980; 56: 377-80.
5. Caiaffa W, Chiari CA, Figueiedo ARP et al. Toxoplasmosis and mental retardation. Report of a case-control study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1993; 88:253-61.
6. Guerina NG, Hsu HW Meissner HC, Maguire JH, Linfield R, Stechenberg B, et al. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection: The New England Regional *Toxoplasma* Working Group. *N. Engl J Med* 1994; 330:1858-63.
7. Horwitz CA. Laboratory investigation of syphilis. *Postgrad, Med* 1980; 68:71-79.

8. Kauamura T. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. Eficiência de um teste. *Arq. Bras. Cardiol*, 2002, vol 79, n 4, São Paulo.
9. Pinon JM, Chemla C, Villena L, et al. Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-toxoplasma gondii immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies, *Journal of Clinical Microbiology*, 1996; 34:579-583.
10. Pinon JM, Dumon H, Chemla C. et al. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39: 2267-71.
11. Roizen N, Swisher CN, Stein MA et al. Neurologic and developmental outcome in treated congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* 1995; 95:11-20.
12. Serra G, Bruschetti PL, Bonacci W, Magliano P, Masromatteo L & Cacciabue E. La lue connatale: criteri diagnostici e condotta terapeutica. *Minerva Pediatr* 1982; 34:749-56.
13. Srinivasan G, Ramamurthy RS, Brarathi A, Voora S & Pildes RS. Congenital syphilis: a diagnostic and therapeutic dilemma. *Pediatr. Infect. Dis* 1983; 2:436-41.
14. Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG et al. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J. Infect Dis* 1990; 162: 270-3.

## **V – CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES**

### **FINAIS**

## 1. CONCLUSÕES

- O sangue de cordão pode ser usado para realizar a sorologia para detecção de anticorpos IgG e IgM *anti-T.gondii*.
- A técnica MEIA apresentou a mesma **s, e, ac, VPP e VPN** que a técnica ELFA, podendo, portanto, ser usada para realização de sorologia em amostras de sangue do cordão umbilical e sangue periférico de RN.
- A sensibilidade das técnicas automatizadas usadas foi de apenas 35,7% no diagnóstico da toxoplasmose congênita pós-natal.
- A IgA *anti-T.gondii* foi menos sensível que a IgM, possivelmente, devido a sensibilidade da técnica usada (ELISA duplo sanduíche).
- A IFI apresentou sensibilidade e especificidade comparável à descrita por alguns autores, 28,6% e 87,5% respectivamente.
- A suspeita de toxoplasmose congênita não pode ser afastada apenas pela ausência dos anticorpos da classe IgM e IgA ou pela negatificação dos anticorpos IgG, principalmente nas crianças tratadas seja na fase intra-uterina ou pós-natal.
- A utilização dos anticorpos da classe IgM *anti-T.gondii* como único marcador de toxoplasmose em RN deve ser reavaliada por muitos profissionais, principalmente, por aqueles que se baseiam apenas nos resultados obtidos do “teste do pezinho”.

## 2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os anticorpos da classe IgM não se comportaram como marcadores seguros para o diagnóstico da toxoplasmose congênita. Por isso a imunologia da toxoplasmose congênita precisa ser melhor estudada, principalmente em indivíduos submetidos a tratamento com terapêutica específica.

É urgente a necessidade de se implantar na Maternidade do Hospital das Clínicas a Reação em Cadeia da Polimerase para detecção do *T. gondii*, a fim de que esteja disponível mais essa importante ferramenta, de resultado rápido, para o diagnóstico da toxoplasmose congênita.

Os métodos automatizados foram excelentes para a quantificação de anticorpos da classe IgG nos RN, por terem se mostrado em níveis muito mais elevados do que os da mãe, quando esses estavam infectados. Faz-se necessário a determinação, pela técnica MEIA ou ELFA, do ponto de corte significativo, em que as concentrações de IgG do RN são maiores que as da mãe, significando que os anticorpos presentes nele foram produzidos em resposta ao estímulo dos antígenos do *T.gondii*. Esse ponto de corte será mais um recurso diagnóstico, mas não será suficiente para afastar a possibilidade de transmissão vertical, uma vez que os mesmos mecanismos que inibem a produção de IgM e IgA, podem inibir a produção dos anticorpos da classe IgG.

O diagnóstico da toxoplasmose congênita é muito complexo, exigindo que estejam disponíveis vários exames laboratoriais e clínicos que possibilitem a conclusão dos resultados com maior rapidez, uma vez que a medicação utilizada não é isenta de efeitos colaterais e a falta de tratamento nos infectados pode ter repercussões dramáticas como seqüelas visuais e/ou neurológicas.

## **VI - RESUMO**

Essa dissertação é composta de duas pesquisas complementares, realizadas no período de primeiro de janeiro de 2004 a 30 de setembro de 2005.

No primeiro estudo, realizou-se a sorologia para IgG e IgM anti-toxoplasma no sangue do cordão de 1514 RN pela técnica MEIA e a comparação entre os resultados dos anticorpos IgG e IgM no sangue de cordão e periférico de 167 RN (86 suspeitos e 81 normais). A sorologia por MEIA permitiu que fossem selecionados 86 RN suspeitos de toxoplasmose congênita, cujas amostras foram testadas para detecção de IgM pela técnica ELFA. A comparação entre a sorologia para IgG e IgM por MEIA mostrou não haver diferença significativa entre os resultados obtidos no sangue de cordão e periférico. A triagem sorológica dos 1514 RN pela técnica MEIA revelou que: 0,59% (09/1514) apresentavam IgG e IgM reagentes; 64,60 (978/1514) apresentavam IgG reagente e IgM não reagente; 0,46% (7/1514) apresentavam IgG indeterminada e IgM não reagente e 34,35% (520/1514) apresentaram IgG e IgM não reagentes. A incidência da toxoplasmose diagnosticada pela presença de IgM pelas técnicas MEIA e ELFA foi de 6,6/1000 nascimentos, contudo essa incidência não reflete o número de RN infectados, pois muitos RN não produzem anticorpos de classe IgM ao nascer, sendo necessário que os 76 RN suspeitos e que tiveram IgM não reagentes sejam acompanhados até dois anos de idade.

O segundo estudo foi realizado nas crianças suspeitas de toxoplasmose congênita acompanhadas no Ambulatório de Infecções Congênicas do HC. Das 86 encaminhadas para acompanhamento, apenas 56 retornaram para consulta. As amostras dessas crianças foram testadas para IgM anti *T.gondii* pelas técnicas MEIA, ELFA e IFI e para IgA por ELISA captura. O diagnóstico da infecção congênita foi concluído em 44 RN, sendo que 28 estavam infectados e 16 não estavam. Dos 28 infectados, 42,9% (12/28) apresentaram IgM reagente pelas técnicas usadas. A sensibilidade,

especificidade, acurácia, valores preditivos positivo e negativo das técnicas MEIA e ELFA foram iguais, respectivamente de 36,7%, 100%, 100%, 47,1% e 59,1%; da IFI 28,6%, 87,5%, 80,0%, 44,4% e 50% e da IgA de 25,0%, 100%, 100%, 43,2% e 52,3%. A IgM foi reagente em 81,8% (9/11) das crianças sintomáticas, demonstrando sua relação com a gravidade da transmissão vertical, com maiores concentrações em crianças mais afetadas pelo processo infeccioso intra-uterino. Por outro lado, não foi detectada em 57,1% (16/28) dos infectados, provavelmente em consequência do tratamento da mãe. A sensibilidade da IgM anti *T.gondii*, associando três técnicas (MEIA, ELFA e IFI) foi de 42,9% (12/28) e da IgA foi de 25% (7/28), mostrando que a suspeita de toxoplasmose congênita não pode ser afastada apenas pela ausência desses anticorpos.



## **VII - ABSTRACT**

That dissertation is composed of two complementary researches, accomplished in the period of first of January from 2004 to September 30, 2005.

In the first study, took place the serology for IgG and IgM antitoxoplasma in the blood of the string of 1514 newborns (NB) for the technique MEIA and the comparison among the results of the antibodies IgG and IgM in the string blood and outlying of 167 NB (86 suspects and 81 normal). The serology for MEIA allowed 86 suspicious NB of congenital toxoplasmosis to be selected, whose samples were tested for detection of IgM by the technique ELFA. The comparison among the serology for IgG and IgM for MEIA showed there not to be significant difference among the results obtained in the string blood and outlying. The screen serological of 1514 newborns for the technique MEIA revealed that: 0,59% (09/1514) they presented IgG and IgM reactivities; 64,60 (978/1514) they presented IgG reactive and IgM no reactive; 0,46% (7/1514) they presented uncertain IgG and IgM no reactive and 34,35% (520/1514) they presented IgG and IgM no reactivities. The incidence of the toxoplasmosis diagnosed by the presence of IgM by the techniques MEIA and ELFA it was of 6,6/1000 births, however that incidence doesn't reflect the number of infected newborns, therefore many newborns don't produce class antibodies IgM when being born, being necessary that the 76 newborns suspects and that had IgM no reactivities they are accompanied up to two years of age.

The second study was accomplished in the suspicious children of congenital toxoplasmosis accompanied at the Clinic of Congenital Infections of HC. Of the 86 directed for accompaniment, 56 only came back for consultation. Those children's samples were tested for IgM anti *T. gondii* for the techniques MEIA, ELFA and IFI and for IgA for ELISA captures. The diagnosis of the congenital infection was concluded in 44 children, and 28 were infected and 16 were not. Of the infected 28, 42,9% (12/28)

they presented IgM reactive for the used techniques. The sensibility, specificity, accurate, values positive and negative predictivos of the techniques MEIA and ELFA were same, respectively of 36,7%, 100%, 100%, 47,1% and 59,1%; of IFI 28,6%, 87,5%, 80,0%, 44,4% and 50% and of IgA of 25,0%, 100%, 100%, 43,2% and 52,3%. IgM was reactive in 81,8% (9/11) of the symptomatic children, demonstrating your relationship with the gravity of the vertical transmission, with larger concentrations in more affected children for the intrauterine infectious process. On the other hand, it was not detected in 57,1% (16/28) of those infected, probably in consequence of the mother's treatment. The sensibility of the IgM anti *T. gondii*, associating three techniques (MEIA, ELFA and IFI) it was of 42,9% (12/28) and of IgA it was of 25% (7/28), showing that the suspicion of congenital toxoplasmosis can't just be moved away by the absence of those antibodies.

## **VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Amato NV & Marchi CR, Toxoplasmose. In:Cimerman B & Cimerman S, eds. Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2002; 160-77.
2. \_\_\_\_\_, Servolo MEA, Levi GC, Seixas DMI. Toxoplasmose. 4. ed. São Paulo: Sarvier; 1995.
3. Ambroise-Thomas P & Okay T. Variations inter et intra-céphales de pathogénicité chez *Toxoplasma gondii*. Conséquences cliniques et épidémiologiques. Bull. Acad. Natle. Méd 1993;177:1411-21.
4. Anderson SE, Remington JS. The diagnosis of toxoplasmosis. South Med J, Palo Alto 1975; 68:1433-1443.
5. Araújo FG. Anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue.Rev Inst Med Trop São Paulo 1970; 12: 105-111.
6. Aspöck H, Pollak A. Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. Scand. J. Infect Dis 1992; 84(Suppl): 32-37.
7. Avelino MM, Campos JD, Castro AM. Fatores de risco relacionados com a toxoplasmose. Rev Brasil Gynecol Obstet 1999; 1(74).
8. \_\_\_\_\_, Parada JCB, Castro AM. Distribuição socio-geográfica da toxoplasmose. Rev Brasil Gynecol Obstet 1999; 1(72).
9. \_\_\_\_\_, “A gestação como fator de risco para primo-infecção pelo *Toxoplasma. gondii*”[Tese]. Brasília/DF: Universidade de Brasília, PPGCS, 2000.

10. Bearman MH., Mc Cabe RE, Wong Sin-Yew, Remington JS. *T.gondii*. In: Mandell D, Bennett's. Principles and practice of infectious diseases. 4. ed. New York : Churchill Livingstone 1996; 2455-2475.
11. Bichara CNC. Perfil epidemiológico da toxoplasmose humana na área metropolitana de Belém/PA: a experiência no serviço de parasitologia do Instituto Evandro Chagas [Dissertação]. Belém: Universidade Federal do Pará, MPEG, EMBRAPA; 2001.
12. Boyer KM., Remington JS, MacLeod RL. Toxoplasmosis. Textboock of Pediatric Infectious Diseases. In: Feigin and Cherry. 4.ed. Philadelphia: WB Saunders Company 1998; 2473-2490.
13. Brisighelli NA. Prevalência da Toxoplasmose em gestantes da cidade de Bragança Paulista - São Paulo [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 1998.
14. Caiaffa W, Chiari CA, Figueiredo ARP et al. Toxoplasmosis and mental relardation. Report of a case-control study. Mem. Inst Oswaldo Cruz 1993; 88:253-61.
15. Camargo ME. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, eds. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001; 278-286.
16. \_\_\_\_\_, Ferreira AW, Mineo JR. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. Infect Immun 1978; 21: 55-58.
17. \_\_\_\_\_, Leser PG, Guarnieri DB, Rocca A. Padronização de testes sorológicos para toxoplasmose, problema urgente da patologia clínica. Rev Bras. Patol. Clín. 1977;13:1-5.

18. Camargo ME, Leser PG, Rocca A. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-Toxoplasma fluorescents tests. A technique for specific results. Rev Inst Med Trop São Paulo 1972; 14: 310-313.
19. \_\_\_\_\_, Moura MEG, Leser PG. Toxoplasmosis serology: na efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. Rev Inst Med Trop 1989; 31:279-285.
20. \_\_\_\_\_, Silva SM, Leser PG, Granato CH. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. Rev Inst Med Trop São Paulo 1991; 33: 213-218.
21. Chumpitaze BFP, Boussaid A, Pelloux H, et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods, J. Clin. Microbiol 1995; 33:1479-85.
22. Contreras MD, Sandoval ML, Salinas P, Muñoz P, Vargas S. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG/IgM/IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y crônica. Bol Chil. Parasitol 2000; 55(1/2):1-10.
23. Couvreur J, Nottin N, Desmonts G. La toxoplasmose congenitale traitee. Resultats cliniques et biologiques. Ann Pediatr 1980; 27:647-62.
24. Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M et al. Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. N Engl J Med 1988; 318(5):271-275.
25. De Vroede M, Dodion J, De Menter F, Piepsz A, Verougstraete C. Congenital toxoplasmosis: late appearance of retinal lesions after treatment. Acta Pediatr Scand 1979; 68: 767-772.
26. Decoster A, Darcy F, Caron A. Anti P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital toxoplasma infection. Clin. Exp. Immunol 1992; 87: 310-315.

27. Derourin F, Mazon MC, Garin YJF. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 1987;1597-1600.
28. Desmonst G, Couvreur J, Alison F, Baudelot J, Gerbeaux J, Lelong M. Etude épidémiologique sur la toxoplasmose: de Influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de infection humaine. Revist Francésè Etudle Clinique Biologie 1965; 10:952-958.
29. \_\_\_\_\_, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. N. Engl. J. Med. 1974b; 290: 1110-16.
30. \_\_\_\_\_, Couvreur J. Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. Bull. N.Y. Acad Med. 1974a; 50: 146-156.
31. \_\_\_\_\_, Daffos F, Forestier F. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. Lancet 1985; 1:500-504.
32. \_\_\_\_\_, Nao Y, Remington JS. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasma infections. J Clin Microbiol 1981; 14: 486-491.
33. Dubey JP, Frenkel JK . Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of toxoplasma cysts. J Protozool 1976; 23: 537-454.
34. Duffy K, Wharton PJ, Johnson J, New L, Holiiman RE. Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting toxoplasma specific IgM. Journal of Clinical Pathology 1989; 42: 1291-1295.
35. Eichenwald HF. A study of congenital toxoplasmosis with particular emphasis on clinical manifestations sequelae and therapy. In: Slim JC. Human toxoplasmosis.



Copenhagen: Muphsgaard;1959. v.2.

36. Feldman HÁ, Miller LT. Serological study of toxoplasmosis prevalence. *Am J Hyg* 1956; 64:320-335.
37. Foulon W, Naessens A, Derde MP. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *Am J Perinatol* 1994; 11:57-62.
38. \_\_\_\_\_. Congenital toxoplasmosis: is screening desirable? *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 1992; 84 (Suppl.): 11-17.
39. Frenkel JR, Dubey JO, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 1970; 167:893-896.
40. \_\_\_\_\_, Ruiz A, Chichilia M. Soil survival of toxoplasma oocysts in Kansas and Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1975; 24: 439-443.
41. \_\_\_\_\_. Toxoplasmose. In: Veronesi R, Focaccia, eds. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Guanabara Koogan; 2002; 1310-1324.
42. \_\_\_\_\_. Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology and immunology. In: Hammond DM, Long PL, eds. *The Coccidia*. Baltimore: University Park Press 1973; 343-410.
43. Garcia APG. Congenital toxoplasmosis in two succesive sibs. *Arch Dis Child* 1979; 43:705-709.
44. Gross U, Roos T, Appoldt D, Heeseman J. Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies agains P30 by using the immunoblot technique. *J Clin Microbiol* 1992; 30(6):1436-1441.

45. Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothryd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymease chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 1990; 28(10): 2297-2301.
46. Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC et al. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. The New England Regional *Toxoplasma* Working Group. *New Engl J Med*, London 1994; 330(26):1858-1863.
47. Hassl A, Tuma W. Toxoplasmosis diagnosis in pregnant women infected with human immunodeficiency virus I. *Pea Infect Dis* 1995; 14:1016-1017
48. Hinrichsen SL, Valente A, et al. Toxoplasmose. In: *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005; 421-27.
49. Hofflin JM, Remington JS. Tissue culture isolation of toxoplasma from blood form a patient with AIDS. *Arch Int Med* 1985; 145: 925-926.
50. Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P et al. Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *J Pediatr* 1989; 115:765-769.
51. \_\_\_\_\_, Daffos F, Costa JM et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction trest on amniotic fluid. *N Engl J Med* 1994; 331:695-9.
52. Israelki DM, Remington JS. Encefalite toxoplásmica em pacientes com AIDS. *Clin Doenças Infec Parasit Amer Norte* 1988; 2:451-469.
53. Jacobs L, Lunde M. A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J Parasitol* 1957; 43:308-314.
54. \_\_\_\_\_, Remington JS, Melton ML. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii* . *J Parasitol* 1960; 46: 11-21.

55. Joynson DH, Payne RA, Rawal BK. Potencial role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis J Clin Pathol 1990; 43: 1032-1033.
56. Kaniak CEA. Toxoplasmose congênita: estudo da forma inaparente em Brasília-DF [Dissertação]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 1991; 77.
57. Kauzoe U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. Parasitologia Humana. 10. ed. São Paulo: Atheneu; 2002; 149-56.
58. Lappalainen M, Koskela P, Hedman K. Incidence of primary *Toxoplasma* infections during pregnancy in southern Finland: a prospective cohort study. Scand J Infect Dis 1992; 24(1): 97-104.
59. Leport C, Vilde JL, Katlama C et al. Failure of spiramycin to prevent neurotoxoplasmosis in immunosuppressed patients. JAMA 1986; 255: 2290.
60. Manual de Instruções de Uso do Sistema AXSYM Toxo IgG e IgM , produzido por Abbott Laboratories. Estados Unidos, 2000.
61. Manual de Instruções de Uso do Sistema VIDAS Toxo IgM, produzido por Bio-Merieux S. A. França, 1998.
62. McAuley J, Boyer KM, Patel D et al. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: The Chicago Collaborative Treatment Trial. Clin Infect Dis 1994; 18:38-72.
63. McCabe R, Remington JS. Toxoplasmosis; The time has come. [Editorial]. N Engl J Med 1988; 318: 313-315.
64. Neves JM, Nascimento LB, Ramos JGL .Martins-Costa SH. Toxoplasmose na gestação. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia 1994, 16(6):197-202.

65. Nóbrega MC. Ocorrência de toxoplasmose em gestantes e em seus recém-nascidos, atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE [Dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 1998.
66. Pedreira DAL. Contribuição ao estudo da toxoplasmose congênita [Dissertação]. São Paulo: Faculdade da Medicina, Universidade de São Paulo, 1995.
67. Pelloux H, Guy E, Angelici MC et al. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, including 15 teams. FEMS Microbiol. Lett. 1998; 165:231-7.
68. Philocreon GR. Toxoplasmose e gravidez: inquérito clínico-epidemiológico em gestantes de Goiânia [Tese]. Goiânia: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás. Rev Goiânia Med; 1976; 22:121-01.
69. Pinon, J.M., Thoanes, H., Gruson, N. An enzyme-linked immunofiltration assay used to compare and maternal antibody profiles in toxoplasmosis. J Immunol Methods, Paris 1985; 77:15-23.
70. Remington JS, Macleod R, Desmonts G, Toxoplasmosis. In: Remington J, Klein J. Infectious diseases of the new-fetus and born infant. 4. ed., Philadelphia: WB Saunders; 1994.
71. \_\_\_\_\_, Cavanaugh EN. Isolation the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. N Engl J Med 1965; 273: 1308-1310.
72. \_\_\_\_\_, Macleod R, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS and Klein JO. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4. ed. Philadelphia : W B Saunders Company; 1995; 140-263.
73. \_\_\_\_\_, Mcleod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, eds. Infectious diseases in the fetus and newborn infant. 5. ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001; 205-346.

74. Rey L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. Parasitologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 1991; 274-85
75. Roizen N, Swisher CN, Stein MA et al. Neurologic and developmental outcome in treated congenital toxoplasmosis. Pediatrics 1995; 95: 11-20.
76. Roos T, Martius J, Gross U, Schrod L. Systematic serologic screening for toxoplasmosis in pregnancy: is it possible to simplify the diagnostic procedures? J Gynecol Obstet Biol Reprod 1993; 22:277-283.
77. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). Science 1948; 108: 660-663.
78. Sáfadi, MAP. Toxoplasmose. Pediatria Moderna; 2000; 36(1/2):9-19.
79. Sinibaldi J, De Ramirez J. Incidence of congenital toxoplasmose in live Guatemalan newborns. Eur J Epidemiol. Netherlands; 1992; 8(4):516-20.
80. Spalding MS, Amendoeira MRR, Ribeiro LC et al. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. Uberaba; 2003; 36(4).
81. Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG et al. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. J Inf Dis, Chicago 1990; 162:270-273.
82. Stray-Pedersen B. A prospective study of acquired toxoplasmosis among 8043 pregnant women in the Oslo area. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1980; 136:399-403.
83. \_\_\_\_\_, Lorentzen-Styr AM. The prevalence of toxoplasma antibodies among 11736 pregnancy women in Norway. Scand J Infect Dis. Estocolmo; 1979; 11:159-165.

84. Thulliez P, Daffos F, Forestier F. Diagnosis of *Toxoplasma* infection the pregnant woman and the unborn child: current problems. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 1992; 84(Suppl.): 18-22.
85. \_\_\_\_\_, Remington JS, Santoro F et al. Une nouvelle réaction d'agglutination pour le diagnostic du stade évolutif de la toxoplasmose acquise. *Path Biol.* 1986; 34:174-7.
86. Van Knapen F, Panggabehn SO, Van Leusden J. Demonstration of *Toxoplasma gondii* antigens in AIDS patients. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1994; 36:525-9.
87. Varella IS, Wagner MB, Darella AC. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. *J Pediatr (Rio de Janeiro)*. Porto Alegre; 2003; 79.
88. Vaz AJ, Guerra EM, Ferrato LCC, Toledo LAS, Azevedo NRS et al. Sorologia positiva para sífilis, toxoplasmose e Doença de Chagas em gestantes de primeira consulta em Centros de Saúde de área metropolitana, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 1990; 24(5):373-379.
89. Veronese R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 1982.
90. Wallon M, Dunn D, Slimani D, Girault V, Gay-Andrieu Peyron F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA. *Eur J Pediatr* 1999; 158 (8):645-649.
91. \_\_\_\_\_, Mallaret MR, Mojon M, Peyron F. Congenital toxoplasmosis, evaluation policy toxoplasmose congenitale, evaluation de la politique de prevention. *Presse Med. Paris*, 1994; 23(32):1467-70.
92. Wilson CB, Remington JS, Stagno S. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital toxoplasma infection. *Pediatrics* 1980; 66(5):767-

774.

93. Wong SY, Hajdu MP, Ramirez R, Thulliez P, McLeod R, Remington JS et al. Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute toxoplasma infection and toxoplasmosis . J Clin Microbiol 1993; 31:2952-2953.
94. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. Clin Infect Dis 1994;18:853-62.

## **IX - ANEXOS**



## ANEXO 1

### **Procedimento usado para realização da IgG e IgM anti-toxoplasma no equipamento AxSYM- Abbott.**

A técnica usada no equipamento AxSYM-Abbott é a MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay ). Os soros são colocados nas racks de amostras, e os reagentes toxo IgG e toxo IgM são colocados no carrossel de reagentes. Os reagentes são calibrados e amostras de controles negativos e positivos são analisadas, a fim de se verificar se os reagentes podem ser usados ou se é necessária a realização de uma nova calibração. Após essa verificação, faz-se a programação dos exames que serão realizados nas amostras dos pacientes.

Os anticorpos IgG anti-*T. gondii* são detectados da seguinte forma: a amostra e todos os reagentes necessários para o teste são pipetados pela probe do centro de amostras dentro de vários poços da célula de reação (RV). A RV é imediatamente transferida para o centro de processamento. A probe de amostra dilui a amostra na solução 4 (diluente de linha) e dispensa uma alíquota da amostra diluída e das micropartículas recobertas com o *T. gondii* em um poço de incubação da RV . O anticorpo contra o *T. gondii* (se presente na amostra) liga-se as micropartículas recobertas com antígenos do parasita formando um complexo antígeno-anticorpo. O diluente do ensaio é adicionado à mistura de reação e uma alíquota do complexo Ag-Ac é transferida à matriz de fibra de vidro (matriz cell). As micropartículas ligam-se de maneira irreversível à matriz que é lavada para remover as partículas não ligadas. O conjugado anti-IgG humano mais a fosfatase alcalina é dispensado sobre a matriz , ligando-se ao complexo Ag-Ac. A matriz é lavada para remover as partículas não

ligadas. O substrato, 4-Metilumbeliferil Fosfato, é adicionado à matriz cell e o produto fluorescente é determinado pelo sistema ótico MEIA. A concentração de IgG anti-toxoplasma é diretamente proporcional a fluorescência emitida pelo produto formado. Os resultados obtidos são interpretados de acordo com os valores de referência fornecidos pelo fabricante.

Os anticorpos da classe IgM são detectados usando os mesmos procedimentos descritos para a IgG, com a diferença de que nesta reação a amostra é tratada com uma substância que retira o Fator Reumatóide, impedindo reações falsamente negativas que podem ocorrer devido a presença destes anticorpos.

## **ANEXO 2**

### **Procedimento usado para realização da IgM anti-toxoplasma no equipamento**

#### **VIDAS da Bio-Merieux**

A técnica usada no equipamento VIDAS é a ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), que realiza a imunocaptura dos anticorpos da classe IgM.

Após uma etapa de diluição do soro, as IgM são capturadas pelo Anticorpo policlonal presente na parede do cone. As IgM anti-toxoplasmas são detectadas especificamente pelo antígeno toxoplásmico inativado, este mesmo revelado por um anticorpo monoclonal anti-toxoplasma, conjugado com fosfatase alcalina. Durante a etapa final de revelação, o substrato é catalisado pela enzima, gerando um produto (4-metil-umbeliferona) cuja fluorescência emitida é medida em 450nm. O valor do sinal é proporcional à concentração de IgM na amostra.

Procedimento de calibração: Na recepção de um novo lote, as especificações devem ser introduzidas no aparelho (VIDAS ou Mini VIDAS) usando o cartão MLE incluído em cada embalagem. Se esta operação não for efetuada antes de começar os testes o aparelho não poderá editar os resultados.

Calibração: a calibração, utilizando o calibrador fornecido na embalagem deve ser efetuada na recepção de cada novo lote após a introdução do cartão MLE. Esta operação permite ajustar a calibração a cada aparelho e à evolução eventual do reagente no decorrer do tempo. O calibrador, identificado por S1, será analisado em duplicata. O valor do calibrador deve estar compreendido nos limites de RFV fixados. Se não for o caso a média não será memorizada: fazer novamente uma calibração.

Procedimento para execução da análise:

1) Numerar o tubo e a ficha do paciente (Ex.: B2, ou seja, seção B, posição 2);

- 2) Pipete o volume adequado de amostra no poço apropriado da barrete;
- 3) Encaixe a barrete corretamente e coloque o cone;
- 4) Feche as portas do equipamento;
- 5) A partir do Menu principal tecle: "Inicialização com identificação" "A" ou "B", dependendo da seção onde foi colocado o teste > "1" a "6";
- 6) Digite o protocolo da amostra
- 7) Retorne à antepenúltima tela (onde aparecem os números de 1 a 6) -->tecle "Inicialização"

A realização do teste tem início, sendo que todos os passos agora são realizados automaticamente.

## ANEXO 3

### **Procedimento técnico usado para realização da IgM anti-toxoplasma por Imunofluorescência Indireta.**

Princípio do método: taquizoítos de *Toxoplasma gondii* são fixados a uma lâmina. Anticorpos contra o protozoário presentes no soro ou líquido do paciente ligam-se ao parasita, e posteriormente um conjugado anti-IgM humano marcado com fluoresceína é adicionado, formando um complexo antígeno-anticorpo-conjugado. Sob a luz de um microscópio de fluorescência o parasita aparece com uma coloração verde-maçã.

Procedimento para execução da análise:

- 1-Diluir as amostras nos seguintes títulos: 10,20,40,80,160,320,640,1280,2560,5120 com tampão PBS;
- 2-Aplicar na lâmina;
- 3-Incubar 30 minutos a 37° C em câmara úmida;
- 4-Lavar 2x por 10 minutos com PBS;
- 5-Cobrir os poços com conjugado (Biolab) diluído, conforme padronização, com azul de Evans;
- 6-Lavar 2x por 10 minutos com PBS;
- 7-Cobrir com glicerina tamponada;
- 8-Colocar lamínula e fazer leitura no microscópio de Imunofluorescência.

## ANEXO 4

### **Procedimento técnico usado para realização da IgA anti-toxoplasma por ELISA captura**

Este teste consiste na detecção de IgA específica para *Toxoplasma gondii*, quando presente na amostra a ser testada, por meio de um teste duplo sanduíche ou ELISA por captura. Para a análise desta imunoglobulina, utiliza-se três controles: o negativo, o positivo I (em duplicata) e o positivo II.

- Os soros e os quatro controles (negativo e positivos I, II e III) são diluídos com solução diluente (Tampão Tris NaCl - pH 7.6, BSA, fenol vermelho, Tween 20-1 %; Timerosal - 0,01%) a 1/20 para neonatos.
- As placas, revestidas com anti-anticorpos anti-IgA, são lavadas uma vez com solução de lavagem e posteriormente adicionados 200uL das amostras diluídas (testes e controles) nos respectivos poços, seguida de incubação a 37 °C por 1 hora.
- Após a incubação despreza-se o conteúdo dos poços e lava-se três vezes com solução de lavagem.
- Adiciona-se 200uL da solução conjugado-antígeno a cada poço da placa. Esta solução é obtida pela adição de volumes iguais da solução antígeno e solução do conjugado (0,3 mL de conjugado concentrado + 15 mL de solução diluente).
- Nova incubação a 37 °C por uma hora é realizada, ao final da qual despreza-se o conteúdo da placa e realiza-se quatro lavagens com solução de lavagem.
- Após esta etapa, adiciona-se 200uL de solução cromogênica [30 mL de tampão de substrato (ácido cítrico e citrato de sódio a 0,05-M pH 5,6,

peróxido de hidrogênio a 0,03%, timerosal a 0,01%) + três tabletes de ortofenilenodamina-2 HCl (OPD)] a cada poço da placa.

- A placa é incubada por trinta minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz.
- Ao término desta fase, adiciona-se 100uL de solução bloqueadora ( $H_2SO_4$  - 4N) a cada poço.
- Realiza-se, então, a leitura da densidade ótica (DO) no leitor de ELISA (Titertek Multiskan® Plus MK II), utilizando o filtro de 492 nm.

Para interpretação dos resultados do ELISA - IgA, é calculado, primeiramente, o ponto de corte obtido pela média das DO referentes às duas amostras de controle positivo.

Em ambos os testes, a DO das amostras são comparadas com o valor do ponto de corte. As amostras com DO maior que o ponto de corte são consideradas positivas para presença de IgA, enquanto as com valores menores, são negativas.

## ANEXO 5

### TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Titulo do Projeto: Diagnóstico da toxoplasmose congênita em recém-nascidos de uma maternidade de referência, através da detecção de anticorpos da classe IgG, IgM e IgA.**

A toxoplasmose é uma doença causada por um "bichinho" que pode estar nas fezes do gato ou em carnes mal cozidas. A doença não causa nenhum problema para a mãe, mas se ela passar para o bebê, quando ele ainda estiver dentro da barriga, pode causar sérios problemas quando ele nascer. Só é possível saber se a mãe teve toxoplasmose se ela fizer exames de sangue durante a gravidez, porque a doença geralmente não apresenta nenhum sintoma.

Com esta preocupação, estamos pedindo o seu consentimento de maneira voluntária para utilizar os resultados dos exames do seu filho neste estudo. O objetivo é fazer o diagnóstico da doença, a fim de que o tratamento no recém-nascido seja começado o mais rápido possível, para diminuir ou evitar as inúmeras seqüelas que essa doença pode causar. O acompanhamento das crianças cujas mães tiveram o exame positivo durante a gravidez, deve ser feito logo após o nascimento, através do exame das condições do bebê, exames de sangue, radiografia de crânio, exame da espinha e exame dos olhos. Se for confirmado que o bebê está doente, este deve ser tratado o mais rápido possível, para diminuir as complicações mais sérias, como visão prejudicada, surdez e deficiência mental.

Como as informações dos resultados dos exames do seu filho poderão fazer parte do estudo, precisamos de sua autorização por escrito. A sua autorização é voluntária, podendo tirar o seu consentimento a qualquer momento, se assim o desejar,



o que não ocasionará nenhum prejuízo para o seu bebê. As informações são confidenciais e não serão identificadas.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase dos estudos, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada com sua participação.

O pesquisador se compromete em utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Concordo voluntariamente que meu filho participe desse estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Assinatura da mãe

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste Estudo.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Assinatura do responsável pelo estudo

## ANEXO 6

### Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

#### Instructions to authors

##### Format / Style

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm.

The manuscript should be arranged in the following order: running title, title, authors' names, institutional affiliations, summary, key words, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, and references. Sponsorships and corresponding author (mentioning fax number and e-mail address) should be as a footnote on the first page.

**Summary:** up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

**Key words:** 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

**Introduction:** should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

**Materials and Methods:** should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

**Ethics:** when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on

human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

**Results:** should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

**Discussion:** should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

**Acknowledgements:** should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

**References:** must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author.

The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus. Consult [www.nlm.nih.gov/serials/lii.html](http://www.nlm.nih.gov/serials/lii.html).

- In the text use authors' surname and date:

Lutz (1910) or (Lutz 1910). With two authors it is (Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912). When there are more than two authors, only the first is mentioned: Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

- At the end of the paper use the following styles:

### **Journal article**

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardiaca da tripanosomiase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 14: 15-61.

### **Book or Thesis**

Morel CM 1983. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

### **Chapter in book**

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, The Prevention of Malaria, John Murray, London, p. 390-398.

**Illustrations:** Figures and tables must be understandable without reference to the text.

- Figures should be mounted on a manuscript-size sheet. Photographs must be sharply focused, well contrasted, black and white glossy prints. Photographs and line drawings must be marked on the back with the author's name, the figure number and an arrow pointing to the top. If mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Legends must be provided on a separate sheet. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. Colour illustrations can only be accepted if the authors defray the cost. However, a colour photograph illustrates the cover of each issue of the

Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover at no charge.

- Tables should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

**Short communications** should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than four printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

**Alternative format:** manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

Once a paper is accepted for publication, the authors must provide:

- a diskette containing the text of the final approved version of the manuscript (including tables and graphics) in Word or Word Perfect for Windows format (Macintosh formats should be converted);
- an **affidavit**, provided by the Editorial Office, signed by all authors. Authors from different countries or institutions may sign in different sheets containing the same basic statement;
- a copyright assignment form, provided by the Editorial Office, signed by the corresponding author.

**Page charges:** there will be no page charges.

**Proofs:** one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

**Offprints:** authors will receive 30 free offprints. An order form will be sent to the author enabling further offprints to be ordered at prices listed on the form.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)