

**FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
DE PORTO ALEGRE**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**MYRIAN MORUSSI REIS**

**IgM E AVIDEZ DE IgG PODEM DETERMINAR  
O RISCO DE TRANSMISSÃO MATERNO-FETAL EM ÁREAS  
COM ALTA PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO *T. GONDII***



**Porto Alegre**

**2006**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**MYRIAN MORUSSI REIS**

**IgM E AVIDEZ DE IgG PODEM DETERMINAR  
O RISCO DE TRANSMISSÃO MATERNO-FETAL EM ÁREAS  
COM ALTA PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO *T. GONDII*.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, visando a obtenção do grau de Doutor em Patologia Experimental.**

**Orientador: Dr. Pedro Alves d'Azevedo**

**Porto Alegre**

**2006**

R375i Reis, Myrian Morussi

IgM e avidéz de IgG podem determinar o risco de transmissão materno-fetal em áreas com alta prevalência da infecção pelo T. gondii / Myrian Morussi Reis; orient. Pedro Alves d'Azevedo. Porto Alegre: FFFCMPA, 2006.

f.: 178 tab. 5 fig.20

Tese (Doutorado) – Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós - Graduação em Patologia. Área de concentração: Patologia Experimental.

1. Toxoplasmose congênita / diagnóstico. 2. Sorologia . 3. IgG / Avidéz.  
I. d'Azevedo, Pedro Alves. II. Título.

C.D.D. 616.936

Ruth Oliveira / Bibliotecária  
CRB10/501

## **DEDICATÓRIA**

A meu esposo Gilberto Bohrer Simões e à minha mãe, Emilia Morussi Reis, a quem privei de atenção em tantos momentos.

A meu sogro, Ruy Lauer Simões, Professor de Histologia, pela dedicação ao ensino na Faculdade de Medicina.

## **AGRADECIMENTOS**

Como esta tese foi construída ao longo de 30 anos, existem pessoas e instituições que contribuíram de forma significativa para a sua realização. A estas um agradecimento especial:

Ao Professor Pedro d’Azevedo, meu orientador, agradeço por permitir que eu percebesse a imagem interna que guarda de mim e a força desta imagem em nosso relacionamento profissional.

Ao Doutor Rudi Hemb, em memória, por confiar em minha capacidade quando eu era apenas um “projeto” e pelos valiosos conselhos.

À colega Maria Madalena Tessaro, do Setor de Imunologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, pelo apoio incondicional, disponibilidade e perseverança, apesar das dificuldades.

À colega Helena Meneghetti, pelo apoio ao Setor de Imunologia quando na chefia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, sem o qual esta tese não teria sido concluída.

À sobrinha e afilhada Natascha Costa Pinto pelas valiosas dicas na formatação e apresentação da tese.

Ao filho de “coração” Ruy Andrade Simões pelos pacientes socorros em informática.

Aos colegas das áreas de Obstetrícia e Pediatria/Neonatologia, especialmente a Flávio Uberti, Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, e a Eleonor Lago, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica, pelas longas conversas em busca de soluções.

À colega Rosângela Agne, pelo incentivo permanente.

Aos professores da Pós-Graduação que enriqueceram esta caminhada com a sua cultura e experiência, especialmente o Prof. José Geraldo Taborda, da Disciplina Bioética, a Profa Arlete Hilbig, da Disciplina Neuroanatomia Funcional, os Profs Márcia Graudenz, Ligia Coutinho e Cláudio Galleano Zettler da Disciplina Patologia Geral.

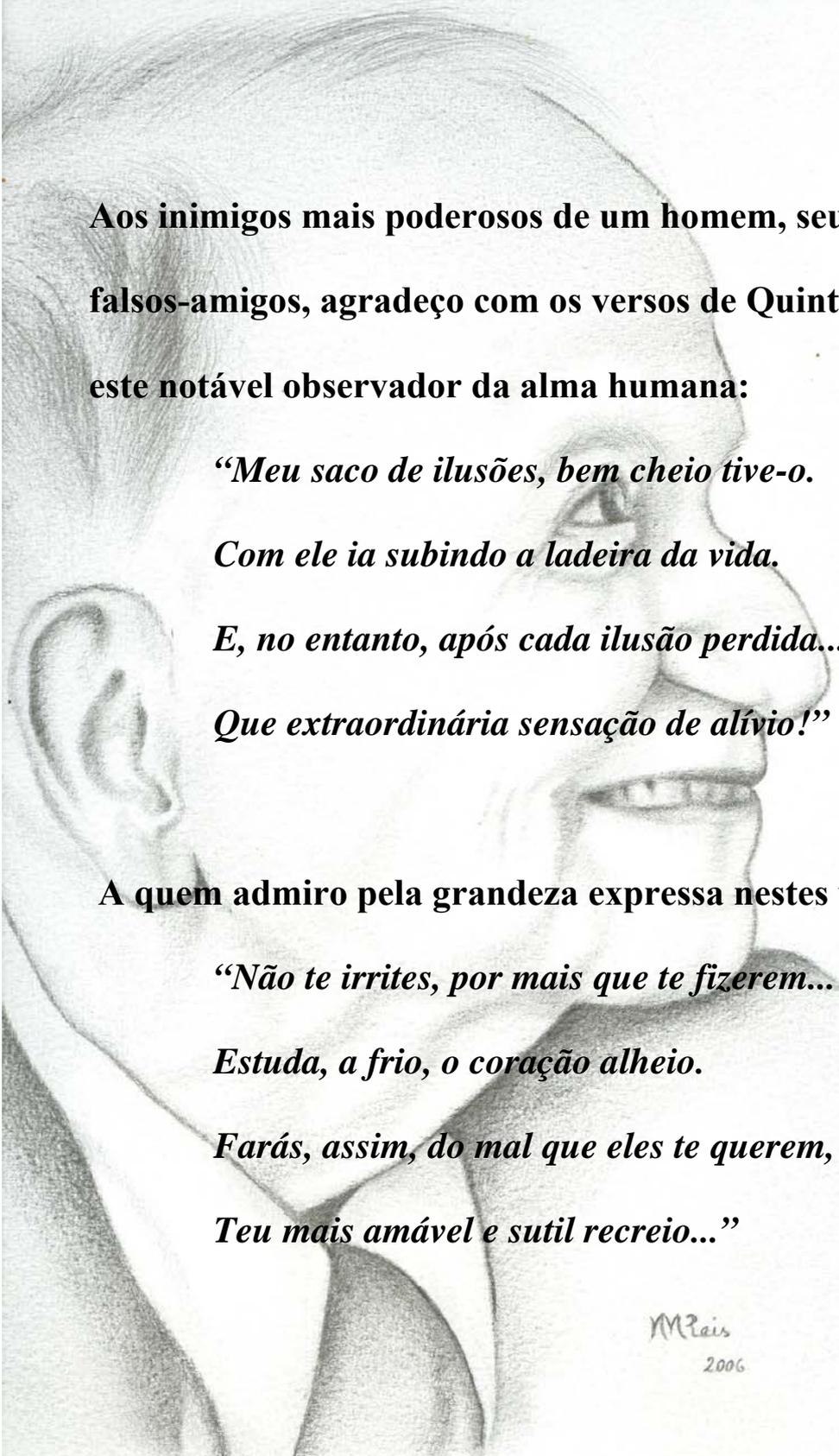
Aos colegas da Pós-Graduação que tornaram esta caminhada leve e agradável pelo companheirismo, especialmente a Laura Meyer da Silva.

À bibliotecária e amiga Ruth Borges Fortes de Oliveira e a Eleonora Liberato Petzhold, pela paciência e auxílio na busca das referências.

Aos alunos da FFFCMPA por manterem acesa a curiosidade e a busca permanente de crescimento pessoal e fundamentalmente, aos pacientes que me presentearam com seu desprendimento, mesmo que não se tenham beneficiado com os resultados desta pesquisa.

Existem, no entanto, pessoas a quem devo muito, muito mais: Plutarco há dois mil anos, escreveu sobre elas:

“Visto que nosso inimigo observa curiosamente nossas ações, é necessário que estejamos atentos a nós mesmos, e essa vigilância transforma-se insensivelmente em hábito de virtude. A emulação é uma contenção moral”.



**Aos inimigos mais poderosos de um homem, seus  
falsos-amigos, agradeço com os versos de Quintana,  
este notável observador da alma humana:**

*“Meu saco de ilusões, bem cheio tive-o.  
Com ele ia subindo a ladeira da vida.  
E, no entanto, após cada ilusão perdida...  
Que extraordinária sensação de alívio!”*

**A quem admiro pela grandeza expressa nestes versos:**

*“Não te irrites, por mais que te fizerem...  
Estuda, a frio, o coração alheio.  
Farás, assim, do mal que eles te querem,  
Teu mais amável e sutil recreio...”*

*M. Reis  
2006*

*“Ao longo da minha vida*

*testemunhei várias revoluções tecnológicas.*

*Nenhuma eliminou a necessidade de caráter nas  
pessoas, ou a capacidade de pensar.”*

**Bernard Baruch**

## RESUMO

A avidéz de IgG anti-*Toxoplasma* foi realizada em 168 amostras IgG e IgM positivas de gestantes, coletadas em qualquer período da gestação, para avaliar o valor preditivo do risco de transmissão materno-fetal em amostra única. A IgM neonatal foi considerada o marcador sorológico de transmissão. Testes fluorométricos foram realizados para IgG, IgM (imunocaptura) e avidéz de IgG. Cinquenta e uma das 128 gestantes testadas tiveram os partos realizados na instituição e a IgM neonatal foi obtida. Os resultados mostraram 32 (62.75%) gestantes com avidéz alta, índices de IgM entre 0,6 e 2,4 e nenhum recém-nascido infectado. Dezenove (37.25%) tiveram avidéz baixa ou inconclusiva, índices de IgM entre 0,6 e 11,9, cinco recém-nascidos infectados e um natimorto. Em dois recém-nascidos infectados e no natimorto, os índices maternos de IgM foram baixos e em um recém-nascido infectado, o único parâmetro materno que sugeriu risco para o feto foi a avidéz de IgG. No presente estudo, a avidéz de IgG realizada em amostras isoladas de gestantes IgM positivas auxiliou a determinar o risco de transmissão durante toda a gestação, especialmente quando os índices dos dois testes foram analisados em relação à idade gestacional. Este modelo pode ser menos oneroso para países em desenvolvimento com alta prevalência da infecção e cria uma nova perspectiva para o diagnóstico da toxoplasmose congênita.

Palavras-chave:

Toxoplasmose congênita - sorologia para toxoplasmose - avidéz de IgG

## SUMMARY

Anti-*Toxoplasma* IgG-avidity was determined in 168 serum samples from IgG- and IgM-positive pregnant women at various times during pregnancy, in order to evaluate the predictive value for risk of mother-to-child transmission in a single sample. The neonatal IgM was considered the serologic marker of transmission. Fluorometric tests for IgG, IgM (immunocapture) and IgG-avidity were performed. Fifty-one of the 128 pregnant women tested gave birth at the hospital and neonatal IgM was obtained. The results showed 32 (62.75%) pregnant women having high avidity, IgM indexes between 0.6 and 2.4, and no infected newborn. Nineteen (37.25%) had low or inconclusive avidity, IgM indexes between 0.6 and 11.9, and five infected newborns and one stillbirth. In two infected newborns and the stillbirth maternal IgM indexes were low and in one infected newborn the only maternal parameter that suggested fetal risk was IgG-avidity. In the present study, IgG-avidity performed in single samples from positive IgM pregnant women helped to determine the risk of transmission at any time during pregnancy, especially when the indexes of the two tests were analysed with respect to gestational age. This model may be less expensive in developing countries where there is a high prevalence of infection than the follow-up of susceptible mothers until childbirth with monthly serology, and it creates a new perspective for the diagnosis of congenital toxoplasmosis.

Key-words:

Congenital toxoplasmosis - serology for toxoplasmosis - IgG-avidity

## LISTA DAS ABREVIATURAS DOS TESTES LABORATORIAIS

AC/HS: acetone (AC) and formalin (HS)-fixed tachyzoites / differential agglutination test

CGMC: Comparative Immunoglobulin G Antibody Profiles between Mother and Child

DA: direct agglutination

DT: Sabin-Feldman dye test

EIA: enzymeimmunoassay

ELFA: enzyme-linked immunofluorescent assay

ELIFA: enzyme-linked immunofiltration assay

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

IB: immunoblot

IC: immunocapture

IFA: immunofluorescent assay

ISAGA: immunosorbent agglutination assay

MEIA: microparticle enzyme immunoassay

PCR: polymerase chain reaction

TSP- PAMFRI: TSL-PAMFRI (*Toxoplasma* Serological Profile-Palo Alto Medical Foundation Research Institute)

WB: Western blotting

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	1
<b>1 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 HISTÓRICO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 FATORES ETIOLÓGICOS.....</b>	<b>5</b>
<b>2 ASPECTOS RELACIONADOS AO PARASITA.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 CLASSIFICAÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 FORMAS FUNCIONAIS.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 MORFOLOGIA.....</b>	<b>7</b>
<b>2.4 CICLO DE VIDA.....</b>	<b>9</b>
<b>2.5 ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE.....</b>	<b>9</b>
<b>2.5.1. Família SAG e possíveis funções.....</b>	<b>10</b>
<b>2.6 INTERCONVERSÃO TAQUIZOÍTAS/BRADIZOÍTAS.....</b>	<b>12</b>
<b>2.6.1 Metabolismo.....</b>	<b>13</b>
<b>2.6.2 Novas ferramentas para analisar interconversão.....</b>	<b>14</b>
<b>3 ASPECTOS RELACIONADOS AO HOSPEDEIRO HUMANO.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 CATEGORIAS CLÍNICAS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.1 Adquirida pela gestante imunocompetente.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2 Adquirida ou reativada pela gestante imunodeficiente.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.3 Congênita .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.4 Ocular .....</b>	<b>20</b>
<b>4 IMUNIDADE AO PARASITA.....</b>	<b>22</b>

<b>4.1 IMUNIDADE CELULAR.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS.....</b>	<b>25</b>
4.2.1 Células apresentadoras de antígenos.....	27
<b>4.3 IMUNIDADE HUMORAL.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 IMUNIDADE NO FETO E NO RECÉM-NASCIDO.....</b>	<b>28</b>
<b>4.5 MODELO EXPERIMENTAL DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.....</b>	<b>30</b>
<b>4.6 MECANISMOS DE “ESCAPE” DO PARASITA.....</b>	<b>30</b>
4.6.1 Fusão incompetente do vacúolo parasitóforo.....	30
4.6.2 Regulação negativa das moléculas MHC classe II pelo parasita.....	31
4.6.3 Alteração na apresentação de antígenos via moléculas MHC classe I...	31
4.6.4 Seqüestro antigênico.....	31
<b>5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 TESTES SOROLÓGICOS.....</b>	<b>33</b>
5.1.1 Imunoglobulina M específica.....	34
5.1.2 Imunoglobulina G específica.....	37
5.1.3 Imunoglobulina A específica.....	40
5.1.4 Imunoglobulina E específica.....	41
5.1.5 Antigenemia.....	41
5.1.6 Comparação de <i>kits</i> comerciais e de <i>kits in house</i> .....	41
5.1.7 Testes propostos como alternativa em situações específicas.....	44
5.1.8 Categorias para infecção primária em gestantes imunocompetentes....	48
5.1.9 Confirmação da sorologia convencional :TSP-PAMFRI, Avidez.....	48
5.1.10 Prevenção da toxoplasmose congênita: novas perspectivas.....	54
<b>5.2 PCR (Polymerase Chain Reaction).....</b>	<b>55</b>
<b>6 MEDIDAS DE PREVENÇÃO.....</b>	<b>58</b>

<b>6.1 PREVENÇÃO PRIMÁRIA.....</b>	<b>58</b>
<b>6.2 PREVENÇÃO SECUNDÁRIA.....</b>	<b>59</b>
<b>6.2.1 Prevenção na gestante.....</b>	<b>59</b>
<b>6.2.2 Triagem materna pós-parto.....</b>	<b>65</b>
<b>6.2.3 Triagem neonatal.....</b>	<b>65</b>
<b>6.2.4 Índices de infecção fetal.....</b>	<b>70</b>
<b>6.2.5 Prevenção no Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas.....</b>	<b>70</b>
OBJETIVOS.....	77
MATERIAIS E MÉTODOS.....	78
RESULTADOS.....	80
DISCUSSÃO.....	86
CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXOS, ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO	
A - Jornal Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia (português) .....	112
B - Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (português).....	133
C - Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (inglês) .....	155
PÓS-FÁCIO.....	177

## INTRODUÇÃO

### 1 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

O termo toxoplasmose é utilizado para descrever a doença clínica ou patológica causada pelo *Toxoplasma gondii*, infecção aguda ou infecção primária assintomática, e a persistência do mesmo nos tecidos, infecção latente ou crônica (REMINGTON et al, 2001).

A toxoplasmose congênita ocorre quando o feto é infectado por taquizoítas que cruzam a placenta a partir da circulação materna durante a infecção primária. A transmissão placentária foi a primeira forma conhecida de transmissão do *T. gondii*, sendo o risco de transmissão relacionado à idade gestacional em que ocorre a infecção materna (DESMONTS & COUVREUR, 1974). Alguns casos de transmissão têm sido observados em gestantes imunocompetentes infectadas antes da concepção (A-MARTY et al, 1991; DOLFFUS et al, 1998; PONS et al, 1995; HENNEQUIN et al, 1997; VOGEL et al, 1996) e em imunodeprimidas ou imunossupressas (DESMONTS, COUVREUR & THULLIEZ, 1990; MARTY et al, 1994; RUSKIN & REMINGTON, 1976).

A presença de infecção prévia à gestação significa que a gestante não está em risco de ter uma criança infectada, exceto em reinfecção, base para as medidas preventivas adotadas em vários países e que provaram ser efetivas (REMINGTON et al, 2001).

#### 1.1 HISTÓRICO

No início do século passado, o *Toxoplasma gondii* foi encontrado no roedor africano

*Ctenodactylus gondii* por Charles Jules Henri Nicole, diretor do Instituto Pasteur de Túnis, e por seu colega Louis Herbert Manceaux, recebendo esta denominação (NICOLE & MANCEAUX apud MOREIRA DE SÁ, BRONCHINI JÚNIOR & CHAVES NETO, 1997). No mesmo ano foi descrito no Brasil por Splendore (SPLENDORE apud MOREIRA DE SÁ, BRONCHINI JÚNIOR & CHAVES NETO, 1997).

Em 1923, o oftalmologista tcheco Josef Janku, mais tarde professor da Universidade de Praga e diretor do hospital oftalmológico da cidade, relatou o primeiro caso no ser humano em um lactente que apresentava hidrocefalia congênita, microftalmia e lesão na mácula, onde encontrou o patógeno identificado como esporozoário (JANKU apud MOREIRA DE SÁ, BRONCHINI JÚNIOR & CHAVES NETO, 1997). Em 1948 foi introduzido o teste do corante de Sabin e Feldman para o diagnóstico da infecção (SABIN & FELDMAN, 1948) e em 1965 foi descoberto o hospedeiro definitivo e compreendido o ciclo vital do protozoário, segundo MOREIRA DE SÁ et al. (1997).

## **1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS**

A infecção pelo *T. gondii* é a zoonose mais difundida no mundo, com prevalências sorológicas que variam de 1% em esquimós a 95% em taitianos (GUARDIOLA & CÉRON, 1981). A prevalência da infecção em gestantes é de 10,9% na Noruega (JENUN et al, 1998); cerca de 15% nos Estados Unidos (JONES, LOPEZ & WILSON, 2003); 6,8 a 17,8% na Inglaterra (ALLAIN et al, 1998); entre 14% (EVENGÄRD et al, 1999) e 24,9% na Suécia (PETERSSON et al, 2000); 21,7% na Tailândia (SUKTHANA, 1999); 23% na Austrália (KARUNAJEEWA, 2001); 27,8% na Dinamarca (LEBECH, 1999); 30% na Áustria (SUKTHANA, 1999); 32% na Argentina (DEL VADO, 1997); 40,2% em Dakar, Senegal (FAY et al, 1998); 43% na Colômbia (GUARDIOLA & CÉRON, 1981); mais de 50% na

França (BESSIÈRES et al, 2000); 57% na Jamaica (PRABHAKAR et al, 1986) e 71,2% no Gabão, Franceville (NABIAS et al, 1998).

Na França, a sorologia mensal nas gestantes suscetíveis ou não-ímmunes ao parasita é determinada por legislação específica. Às vezes, este acompanhamento é interrompido antes do parto e, se a infecção materna é tardia, resulta na não-detecção da infecção na criança, com risco de seqüelas tardias potencialmente severas (WALLON et al, 2001).

A prevalência da infecção pelo *T. gondii* é extremamente alta no Brasil, onde se estima o nascimento anual de 60.000 crianças com toxoplasmose congênita (ALVES NETO & CORREA apud MOREIRA DE SÁ, BROCHINI JÚNIOR & CHAVES NETO, 1997). Na cidade do Rio de Janeiro em 1987, a prevalência foi de 71% em pessoas de 16 a 20 anos. Em outras cidades brasileiras, a soropositividade em adultos chega a 50% ou é até maior (CAMARGO, 2001).

Entre 1997 e 1999, a alta prevalência de uveíte por toxoplasmose em Campos dos Goitacazes, no Rio de Janeiro, levou ao estudo da prevalência da infecção e dos fatores de risco nesta região. Em 1.436 pessoas avaliadas, a soropositividade foi de 84%, 62% e 23% nos grupos de baixo, médio e alto nível socioeconômico respectivamente, sendo a água associada com a transmissão de oocistos (OLIVEIRA-BAHIA et al, 2003).

A diferença na prevalência entre grupos socioeconômicos distintos também foi observada em Uberlândia, Minas Gerais. O estudo comparativo da toxoplasmose congênita entre hospitais públicos e privados nesta cidade mostrou diferenças significativas quanto à prevalência, 57,65 e 41,9% respectivamente, e quanto à frequência de toxoplasmose

congênita, 0,8% e 0%, respectivamente, em 500 amostras de sangue de cordão umbilical provenientes de hospitais públicos e 305 amostras provenientes de hospitais privados. Os autores enfatizam a importância de programas de triagem na gestante, especialmente em hospitais públicos, devido à taxa elevada de toxoplasmose congênita nestes centros (SEGUNDO et al, 2004).

Um programa de triagem neonatal para a detecção de IgM específica foi implementado em Porto Alegre pelo Centro de Triagem Neonatal e Laboratório Nobel, instituição particular que analisou 140.914 amostras provenientes de todo o país, encontrando 47 casos de toxoplasmose congênita confirmados, sendo que oito apresentavam manifestações clínicas. No Rio Grande do Sul, a prevalência encontrada foi de aproximadamente um recém-nascido infectado em 4.800 recém-nascidos (NETO et al, 2000).

O estudo da toxoplasmose ocular levou o Rio Grande do Sul, com uma prevalência de até 86% em algumas regiões, a ser dividido em três regiões quanto à prevalência da infecção: alta (Encosta do Nordeste e Alto Uruguai), menor (Planalto Médio) e mais baixa (Depressão Central e Campanha). As razões consideradas para as diferenças foram geográficas, climáticas, culturais e étnicas, apesar de ter sido considerada também a existência de cepas diferentes do parasita (MELAMED, RAFFIN & AGNES, 1981). Várias contribuições de MELAMED e colaboradores sobre lesões oculares na toxoplasmose podem ser encontradas na literatura (MELAMED et al, 1992; MELAMED et al, 2000; SPADONI et al, 2006).

A prevalência de infecção em 812 gestantes no pré-natal do Hospital de Clínicas em Porto Alegre foi de 54,3%, sendo quatro crianças clinicamente infectadas: dois casos de

retardo no crescimento intra-uterino, um caso de infecção clínica e um caso de cisto craniano, os dois últimos também associados a retardo no crescimento (NEVES et al, 1994).

A incidência mais elevada de toxoplasmose congênita no Estado foi de 2,1% em Erechim (SILVEIRA, 1997). Em Passo Fundo, 1.250 amostras de sangue de cordão foram analisadas e um recém-nascido assintomático foi IgM positivo, apresentando lesões cicatriciais de retinocoroidite bilateral na região temporal ao exame de fundo de olho e alterações na citologia e no exame bioquímico de líquido cefalorraquidiano. A incidência de toxoplasmose congênita foi de 8 /10.000. A distribuição quanto ao *status* socioeconômico revelou que 84,5% das gestantes situavam-se em C, D e E (MOZZATTO & PROCIANOY, 2003). Lago et al. (2003) estimaram a incidência de toxoplasmose congênita em Porto Alegre de 6 /10.000 associando a triagem pré-natal e neonatal.

A prevalência de toxoplasmose congênita no Estado e, também, no País, é, seguramente maior. A exclusão de infecção congênita quando existe risco de infecção materna aguda deve ser feita pelo acompanhamento clínico e sorológico da criança até o final do primeiro ano de vida. A pesquisa de IgM neonatal, mesmo com técnica de alta sensibilidade, como critério único para diagnóstico de infecção fetal, falha na detecção de todos os casos.

#### **1.4 FATORES ETIOLÓGICOS**

O *T. gondii* pode ser transmitido por três vias importantes: (a) ingestão de carne infectada crua ou mal cozida. Nos Estados Unidos, a metade das mortes atribuídas à toxoplasmose por ano, acredita-se ser causada por carne contaminada, o que torna a toxoplasmose a terceira causa de mortes no país atribuídas à alimentação; (b) ingestão de

oocistos, uma forma resistente do parasita eliminada pelas fezes do gato infectado, ao qual o homem se expõe quando limpa os dejetos do animal, na jardinagem ou ao se alimentar com frutas ou vegetais inadequadamente lavados e (c) infecção fetal, na maioria dos casos quando a gestante faz a infecção primária durante a gestação (LOPEZ et al, 2000).

Quando se considera toxoplasmose no diagnóstico diferencial de um paciente, é importante lembrar que a exposição a gatos não deve ser enfatizada. A transmissão do parasita ocorre, essencialmente, sem o conhecimento do indivíduo através da ingestão de água ou vegetais contaminados com oocistos ou de carne mal cozida contaminada com cistos do parasita. Gatos domésticos que recebem apenas alimentos cozidos não estão em risco de adquirir a infecção e transmiti-la ao homem. A pesquisa de anticorpos no gato para estabelecer se é uma fonte potencial de infecção deve ser desencorajada, já que a presença de anticorpos não significa disseminação de oocistos. A prevalência da infecção em gatos em determinada localidade é similar à humana (MONTROYA, 2002).

## **2 ASPECTOS RELACIONADOS AO PARASITA**

### **2.1 CLASSIFICAÇÃO**

O *Toxoplasma gondii*, parasita humano intracelular obrigatório, pertence ao reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia. Os parasitas da classe Sporozoa possuem um ciclo de vida complexo, com fases reprodutivas alternadas: sexual no intestino dos hospedeiros definitivos, o gato e outros animais da família Felidae, e assexual, em todos os demais hospedeiros (HEYNEMAN, 1998). Infecta virtualmente qualquer tecido de mamífero e ave examinado (LEKUTIS et al, 2001).

### **2.2 FORMAS FUNCIONAIS**

Há quatro formas funcionais distintas de *T. gondii*. Os taquizoítas proliferam e se disseminam rapidamente no hospedeiro, afetando indiscriminadamente muitos tipos celulares no processo. Os bradizoítas crescem lentamente dentro dos cistos localizados nos tecidos cerebral e muscular e podem infectar novos hospedeiros através da ingestão. Os merozoítas resultam da divisão assexual em enterócitos felinos, necessária para aumentar a densidade de parasitas, antes do desenvolvimento sexual. Os esporozoítas são o produto da fase sexual e, como os bradizoítas, podem causar infecção através da ingestão. Assim, há considerável variação no tropismo celular entre as quatro formas infectantes (LEKUTIS et al, 2001).

### **2.3 MORFOLOGIA**

Quanto à morfologia, os trofozoítas mostram-se em forma de barco, com paredes finas, medindo 4-7 x 2-4 µm no interior das células teciduais, sendo ligeiramente maiores no espaço extracelular. Coram-se fracamente pelo método de Giemsa. As células fixadas usualmente aparecem em forma de crescente. Ocasionalmente, observam-se agregados

intracelulares compactos. Os cistos são encontrados no cérebro e em outros tecidos. Contêm muitos milhares de bradizoítas semelhantes a esporos que são capazes de iniciar uma nova infecção no animal ou ser humano que ingerir alimento contaminado (Figuras 1 e 2). O *T. gondii* pode ser cultivado na presença de células vivas: em culturas celulares ou em ovos nas temperaturas de 37 a 39°C, onde se observam microrganismos intra e extracelulares típicos.



Figura 1- Bradizoítas em pseudocisto, [www.fcm.unicamp.br/.../anatomia/lamneuro](http://www.fcm.unicamp.br/.../anatomia/lamneuro)

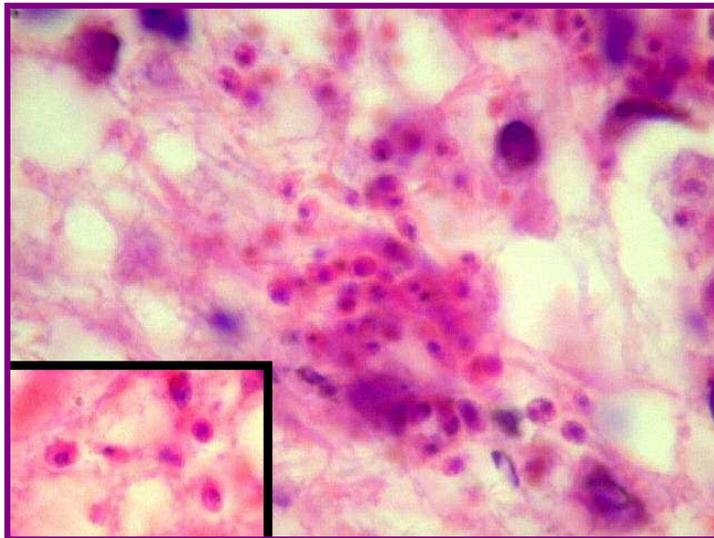


Figura 2 -Taquizoítas em tecido nervoso, [www.fcm.unicamp.br/.../anatomia/lamneuro](http://www.fcm.unicamp.br/.../anatomia/lamneuro)

## **2.4 CICLO DE VIDA**

No gato, os esporozoítas provenientes de oocistos ou os bradizoítas provenientes de cistos teciduais invadem as células da mucosa do intestino delgado, onde formam esquizontes ou gametócitos. Após a fusão sexual dos gametas, os oocistos se desenvolvem, passam das células para a luz intestinal, sendo eliminados nas fezes. Os oocistos infectantes são resistentes. No interior de cada oocisto formam-se dois e, em 48 horas, quatro esporocistos. O oocisto com oito esporocistos pode repetir o ciclo sexuado se ingerido pelo gato. Se ingerido por pássaros ou outro mamífero, inicia o ciclo assexuado (HEYNEMAN, 1998).

No homem, o oocisto abre-se no duodeno, libera os esporocistos que migram através da parede intestinal, caem na circulação e infectam várias células onde formam trofozoítas que se multiplicam, causam ruptura celular e disseminam a infecção. Os taquizoítas se multiplicam rapidamente e são os responsáveis pelo estágio agudo da doença. Infectam células nervosas, sobretudo do cérebro e dos olhos, onde passam a se multiplicar lentamente, na forma de bradizoítas, formando cistos teciduais quiescentes e iniciando o estágio crônico da infecção (HEYNEMAN, 1998).

Existe uma considerável variação entre cepas quanto à infecciosidade e à virulência, possivelmente relacionada ao grau de adaptação a determinado hospedeiro, todas pertencentes a uma única espécie (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002).

## **2.5 ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE**

A superfície de taquizoítas e bradizoítas é coberta com antígenos ancorados em glicosilfosfatidilinositol (GPI), a maioria constituída de membros das famílias de antígenos de superfície SAG1 e SAG2. Estas moléculas foram identificadas primeiro bioquimicamente e

parecem ter um papel na invasão da célula do hospedeiro, na modulação imune e ou atenuação da virulência, embora possam também proteger o parasita, garantindo a sua sobrevivência. Por exemplo, o taquizoíta no pulmão de uma ave necessita uma cobertura diferente da necessária ao bradizoíta no trato gastrintestinal do felino (LEKUTIS et al, 2001).

### **2.5.1 Família SAG e possíveis funções**

Existem 21 genes do *T. gondii* clonados, distribuídos através do genoma, mas muito pouco se conhece sobre seus padrões de expressão. Resultados de numerosos estudos sugerem que as proteínas têm papel na biologia do parasita, como a SAG1, crucial na imunomodulação e na atenuação da virulência e a SAG3, importante para a sua fixação.

Com exceção de SAG1, o perfil completo de expressão para a maioria dos genes nas quatro formas do *T. gondii* não é conhecido. Existem cinco principais antígenos de superfície em taquizoítas: p43, p35, p30, p23 e p22, dois deles, p43 (SAG3) e p23 são também expressos em bradizoítas. A expressão de SRS2 (R-recombinante) é específica para taquizoítas. Quatro antígenos específicos de bradizoítas foram definidos: p36, p34, p21 e p18. Recentemente foi observado que SAG5A é, também, expresso exclusivamente por bradizoítas. Existem membros da família SAG2, SAG2A e SAG2B, detectados apenas em taquizoítas, enquanto SAG2C e SAG2D têm sido detectados apenas em bradizoítas maduros. A relação entre genes, proteínas de superfície e expressão em taquizoítas e bradizoítas pode ser observada na Tabela 1.

Esporozoítas expressam os dois principais SAGs imunogênicos, de cerca de 67 e 25 kDa, não clonados, na ausência dos antígenos imunodominantes do taquizoíta, SAG1 e SAG2.

Tabela 1- Genes, proteínas de superfície e expressão em taquizoítas e bradizoítas (LEKUTIS et al, 2001).

Gene	proteína	taquizoíta	bradizoíta
SAG 1	P 30	+	-
SRS 1		+	-
SRS 2		+	-
SRS 3	P 35	+	-
SAG 2A	P 22	+	-
SAG 5B		+	-
SAG 5C		+	-
BSR 4	P 36	-	+
SAG 2C		-	+
SAG 2D		-	+
SAG 4A	P 18	-	+
SAG 5A		-	+
SAG 3	P 43	+	+
SAG 2B		+	?

Não existem estudos moleculares sobre o merozoíta, mas a expressão de SAG1, SAG2C/D e SRS2 não foi observada neste estágio (LEKUTIS et al, 2001). Informações sobre a estrutura do cisto iniciaram a aparecer na literatura. Já existem dois antígenos relacionados ao cisto, a glicoproteína de parede CST1 e o antígeno relacionado à matriz, (MAG)1 (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002).

O desenvolvimento de ferramentas como IFN $\gamma$  (interferon), temperatura elevada e pH alcalino, usadas para induzir diferenciação *in vitro*, tem permitido o estudo mais pormenorizado deste estágio. É importante lembrar, no entanto, que a expressão de antígenos

pode não ser adequadamente estimulada em cultura, assim, o que ocorre *in vitro*, não é necessariamente o que ocorre *in vivo* (LEKUTIS et al, 2001).

## **2.6 INTERCONVERSÃO TAQUIZOÍTAS/BRADIZOÍTAS**

O início da infecção e a doença aguda se caracterizam pela presença de taquizoítas de replicação rápida. Cerca de 10 a 14 dias pós-infecção, os taquizoítas diferenciam-se em bradizoítas que replicam mais lentamente e formam cistos nos tecidos. Os cistos têm vida longa e não causam doença. No entanto, em imunodeficientes como pacientes com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) ou com doenças malignas, a ruptura de cistos e a transformação de bradizoítas em taquizoítas resulta em reativação da doença. Indivíduos com infecção congênita também têm risco de reativação, notavelmente no cérebro e nos olhos, por razões ainda desconhecidas (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002).

A interconversão taquizoítas/bradizoítas não tem um papel central somente no estabelecimento da infecção crônica, é também responsável pela reativação. Entender este processo pode auxiliar no desenvolvimento de drogas mais efetivas, capazes de eliminar cistos, o que não é obtido ainda com as drogas em uso (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002).

Mesmo que relatos de estruturas semelhantes a cistos existam desde 1963, só a partir de 1993 tem-se informações de sistemas confiáveis *in vitro* para o estudo da interconversão, sendo o crescimento do *T. gondii* em meio alcalino que leva a seu encistamento por *stress*, o mais amplamente utilizado (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002).

Circunstâncias fisiológicas relevantes que podem ter um papel *in vivo* incluem o NO (óxido nítrico), também inibidor da função mitocondrial, e o choque térmico causado pela febre. É difícil, no entanto, demonstrar qualquer papel destes fatores *in vivo*. Fatores imunológicos como o IFN $\gamma$  e o TNF (Fator de Necrose Tumoral) controlam o crescimento de taquizoítas e poderiam controlar a interconversão indiretamente, embora não se sabe como isto ocorre. Evidências sugerem um efeito indireto causado pelo *stress* induzido pelo NO (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002).

A diferença fundamental entre taquizoítas e bradizoítas é a resistência à digestão ácida pela pepsina, mesmo que esta característica não seja aceita como critério único na diferenciação e *in vitro* marcadores moleculares sejam utilizados para identificar cistos maduros (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002).

A conversão taquizoítas/bradizoítas é associada com alterações moleculares e morfológicas que incluem a expressão dos antígenos específicos de estágio e alterações metabólicas (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002). Os fatores que afetam a interconversão podem ser observados na Figura 3.

### **2.6.1 Metabolismo**

Taquizoítas e bradizoítas mostram diferenças relacionadas ao metabolismo de carboidratos, provavelmente ligadas a diferenças no ciclo do ácido tricarboxílico e na via de fosforilação oxidativa. Bradizoítas possuem uma enzima, a adenosina trifosfatase tipo P, ausente nos taquizoítas. Enzimas específicas para taquizoítas e bradizoítas têm sido observadas na sintase do fosfatidilinositol (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002).



Figura 3 - Fatores que afetam a interconversão (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002)

### 2.6.2 Novas ferramentas para analisar interconversão

Muitas técnicas são necessárias nesta análise para identificar genes de interesse e gerar parasitas em que genes específicos de estágio sofreram *knockout*, avaliando o efeito de genes individuais durante a interconversão. Novas técnicas como a *multi-specific, competitor plasmid*, pSWITCH, associada a *competitive reverse transcriptase* - PCR (polymerase chain reaction) em estudos de interconversão, poderão auxiliar a conhecer a hierarquia da expressão gênica e a monitorá-la (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002).

A identificação dos mecanismos que controlam a transcrição e a translação gênica poderá não só esclarecer a patogênese da toxoplasmose, como sugerir estratégias para intervenção terapêutica. A caracterização de moléculas de superfície estágio-específicas poderá auxiliar no desenvolvimento de vacinas, sugerir meios de prevenção e definir alvos para a intervenção terapêutica, em especial anti-bradizoítas (LYONS, MCLEOD & ROBERTS, 2002).

### **3 ASPECTOS RELACIONADOS AO HOSPEDEIRO HUMANO**

#### **3.1 CATEGORIAS CLÍNICAS**

Para propósitos clínicos, a toxoplasmose pode ser dividida em cinco categorias: (1ª) adquirida por pessoa imunocompetente, (2ª) adquirida durante a gestação, (3ª) adquirida ou reativada por pessoa imunodeficiente, (4ª) congênita e (5ª) ocular. Independentemente da categoria, a apresentação clínica não é específica para toxoplasmose e no diagnóstico diferencial deve-se considerar um número de condições. Além disso, os métodos diagnósticos e sua interpretação podem diferir para cada categoria. Por motivos didáticos, a toxoplasmose adquirida durante a gestação será discutida considerando o estado imunológico da gestante (MONTROYA, 2002).

##### **3.1.1 Adquirida pela gestante imunocompetente**

O diagnóstico clínico da infecção materna é raro porque a infecção é assintomática em pessoas imunocompetentes ou cursa com sintomas inespecíficos. A maioria das gestantes cujos filhos tem infecção congênita é assintomática. Apenas 1 a 5% das pessoas com infecção aguda têm sintomas como linfadenopatia, principalmente cervical, fadiga sem febre, mialgia e cefaléia, que podem aparecer isoladas ou combinadas e que resolvem em semanas ou meses sem tratamento específico (BOHNE, HOLPERT & GROSS, 1999; LOPES et al, 2000).

O diagnóstico diferencial é com mononucleose infecciosa causada pelo Epstein-Barr vírus ou com infecção pelo citomegalovírus. A adenomegalia pode permanecer por tempo indeterminado. Os linfonodos são usualmente discretos, firmes e móveis. Por esta razão, toda gestante com linfadenomegalia deve ser investigada para infecção aguda pelo *T. gondii*. Manifestações mais raras incluem uveíte aguda e retinocoroidite, polimiosite, erupções

cutâneas, hepatite, envolvimento pulmonar, renal, cardíaco e de Sistema Nervoso Central.

### **3.1.2 Adquirida ou reativada pela gestante imunodeficiente**

A infecção pelo *T. gondii* é controlada principalmente pela imunidade celular do hospedeiro, tendo o IFN $\gamma$  um papel central. Condições que alteram este tipo de resposta imune, como infecção avançada pelo HIV (Human Immunodeficiency Virus) ou terapia imunossupressora após transplante de órgãos, podem induzir à reconversão de bradizoítas dormentes em taquizoítas de replicação rápida, o que resulta em toxoplasmose cerebral com alta mortalidade.

Se a infecção primária ocorre em indivíduo com comprometimento da imunidade, a resposta imune não leva à conversão de taquizoítas em bradizoítas. Toxoplasmose pulmonar deve ser considerada no diagnóstico diferencial em pacientes imunodeprimidos ou imunossupressos com pneumonia (BOHNE, HOLPERT & GROSS, 1999)

Encefalite por toxoplasmose é a infecção oportunista de Sistema Nervoso Central mais comum em indivíduos HIV positivos. Desenvolve-se quando as contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> são inferiores a 100 células /mm<sup>3</sup> em 20 a 50% dos pacientes com SIDA e IgG anti-*T. gondii*. A presença de anticorpos contra o parasita é um indicador de risco. Pacientes com encefalite têm níveis muito mais elevados de anticorpos que pacientes sem encefalite. Presença de IgG específica associada a contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> inferiores a 150 células /mm<sup>3</sup> é altamente preditiva do desenvolvimento de encefalite (HELFGOTT, 1999).

Toxoplasmose é associada com 5 a 8% de linfadenopatia de origem desconhecida em pacientes imunocompetentes, mas a incidência em pacientes com SIDA é muito maior

(NEWTON, 1999). A transmissão congênita do *T. gondii* em gestantes HIV positivas é 400 vezes maior do que em gestantes HIV negativas (HELFGOTT, 1999). A baixa imunidade materna favorece a transmissão placentária do *T. gondii* em gestantes co-infectadas. Nestas, a infecção pelo HIV pode acelerar o desenvolvimento de toxoplasmose fetal e vice-versa. Nas gestantes HIV positivas, é necessário solicitar a sorologia para toxoplasmose. As soropositivas devem receber tratamento específico para reduzir o risco de toxoplasmose congênita. Além disso, as crianças devem ser avaliadas clínica e sorologicamente ao nascer e acompanhadas por um longo período. As soronegativas devem receber orientações para evitar a infecção primária (THIERMANN, MUÑOZ & ATIAS, 1996).

### **3.1.3 Congênita**

Remington et al. (2001) classificaram a doença no recém-nascido em quatro formas: (1ª) infecção subclínica, (2ª) doença neonatal, (3ª) doença nos primeiros meses de vida e (4ª) seqüelas. A tétrede clássica com hidrocefalia, retinocoroidite, calcificações intracranianas e retardo mental é rara.

A maioria dos recém-nascidos é assintomática ou tem sintomas inespecíficos como crescimento intra-uterino retardado simétrico, hidropsia não-imune, hepatoesplenomegalia, icterícia e púrpura. Algumas crianças desenvolvem seqüelas tardias oculares ou de Sistema Nervoso Central. O diagnóstico da doença é clinicamente difícil devido ao polimorfismo do quadro clínico.

Uma minoria de recém-nascidos com infecção congênita apresenta manifestações severas ou as desenvolve na infância. Estas manifestações incluem hidrocefalia ou microcefalia, retinocoroidite bilateral macular ou peri-macular simétrica, calcificações

intracranianas e retardo mental. Como a infecção é sistêmica, fígado, coração e pulmões podem também ser comprometidos.

O prognóstico da toxoplasmose congênita está relacionado às seqüelas presentes no recém-nascido ou que poderão surgir nos primeiros anos de vida. A ultra-sonografia na gestante é um método não-invasivo útil tanto para o diagnóstico de infecção sistêmica quanto para o acompanhamento mensal quando há risco de infecção fetal. Calcificações, dilatação ventricular, hepatomegalia ou aumento da espessura da placenta indicam mau prognóstico (FARIA COUTO, 1998). Deficiência auditiva de origem central também tem sido descrita (AZEVEDO et al, 2000).



Figura 4: RN com exantema

maculopapular

<http://www.dermis.net/doia/diagnose.asp>



Figura 5: RN com exantema maculopapular

<http://www.dermis.net/doi/diagnose.asp>

Tabela 2 - Possíveis sinais e sintomas da Toxoplasmose Congênita na infância e mais tardios

Adaptado de JONES, LOPEZ & WILSON, 2003

Possíveis sinais precoces e tardios de Toxoplasmose Congênita*		
Anormalidades no líquido	Hepatomegalia	Retardo mental
Anemia	Hidrocefalia†	Microcefalia
Retinocoroidite†	Calcificações intracranianas†	Espasticidades e paralisias
Convulsões	Icterícia	Esplenomegalia
Surdez	Dificuldades no aprendizado	Trombocitopenia
Febre	Linfadenopatia	Dificuldade visual
Retardo no crescimento	Exantema maculopapular	

\*A maioria dos RN com toxoplasmose congênita é assintomática ao exame neonatal de rotina.

† Sinais da tríade clássica que sugere a presença de toxoplasmose congênita.

### 3.1.4 Ocular

A lesão ocular causada pelo *T. gondii* mais freqüente é a retinocoroidite, que pode ser uni ou bilateral. Estrabismo e microftalmia estão associados à infecção congênita tardia (WIRDEN et al, 1999).

Em 530 pacientes com retinocoroidite por toxoplasmose no Rio Grande do Sul, 74% entre 10 e 39 anos, a região central da retina foi atingida em 46% das lesões (MELAMED, 1991). O estudo mostrou as seguintes formas clínicas: (a) cicatricial, bilateral, única e central na infância, (b) ativa, monocular, única e periférica em adolescentes e adultos e (c) cicatriciais, monoculares, únicas e periféricas em adultos com mais de 50 anos. As retinocoroidites cicatriciais predominaram na infância e após os 50 anos, as ativas em adolescentes e adultos jovens. As lesões foram monoculares em 72% dos pacientes (MELAMED et al, 1992). O autor considera ser provavelmente adquirida a toxoplasmose ocular na maioria dos adultos. Em estudo anterior, chamou a atenção para dois aspectos pouco usuais da retinocoroidite observada no Estado: (1º) o grande número de casos familiares e (2º) os aspectos morfológicos das lesões que aparecem em pequena zona central, estendem-se concentricamente em forma tridimensional até a periferia e a esclera, até atingir o grau máximo, e cicatrizam da periferia ao centro, onde a necrose e os fenômenos inflamatórios são mais intensos e duradouros (MELAMED, 1988).

Lesão típica de retinocoroidite congênita antes e após tratamento pode ser observada nas figuras 6 e 7.

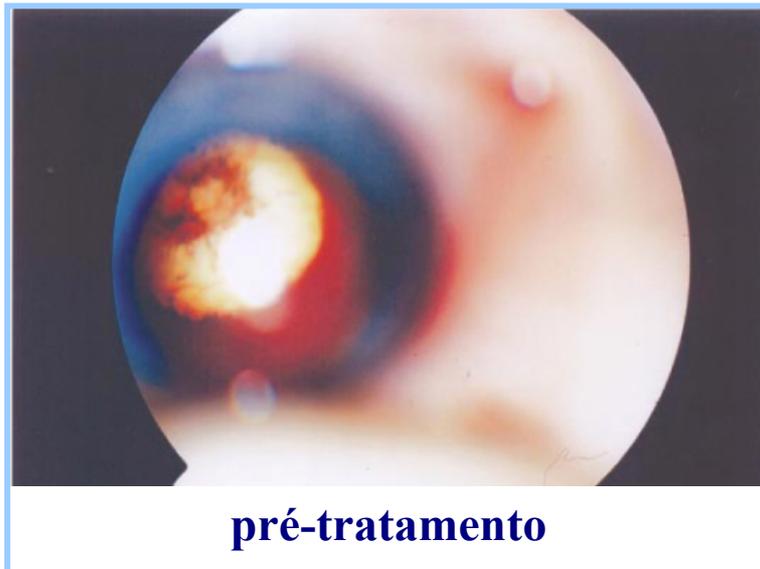


Figura 6: lesão macular OE grau I, típica de retinocoroidite congênita aos 12 meses de idade (SPALDING et al, 2002)



Figura 7: aos 24 meses (SPALDING et al, 2002)

#### 4 IMUNIDADE AO PARASITA

O *T. gondii* tem sido reconhecido como importante patógeno oportunista de fetos, recém-nascidos e pacientes imunodeprimidos. Durante a fase aguda, os taquizoítas são capazes de invadir, residir e replicar em vacúolos especializados, os vacúolos parasitóforos, em qualquer tipo celular. A infecção, tanto de células fagocíticas quanto de células não-fagocíticas, faz-se através de um processo de penetração ativo potencializado pelo próprio parasita. A membrana dos vacúolos contém tanto proteínas de membrana da célula do hospedeiro, como proteínas do próprio parasita (LÜDER & SEEGER, 2001).

A resposta imune adequada faz com que os taquizoítas se diferenciem em bradizoítas formadores de cistos latentes que persistem predominantemente em tecidos musculares e neurais. A parede do cisto é semelhante mas mais especializada que a membrana do vacúolo. A composição e, portanto, a apresentação de antígenos, pode variar consideravelmente entre taquizoítas e bradizoítas. Os aspectos relacionados aos taquizoítas têm sido mais estudados. Pouco se sabe sobre a apresentação de antígenos durante a resposta imune ao bradizoíta, assim como quanto aos mecanismos celulares envolvidos (LÜDER & SEEGER, 2001).

Assim que o parasita encontra o sistema imune, induz rapidamente a produção de IL-12 (interleucina), provavelmente a partir de células dendríticas. Células NK (*natural killers*, imunidade inata) e linfócitos T são ativados e induzidos a sintetizar IFN- $\gamma$ , o maior mediador da resistência do hospedeiro durante as fases aguda e crônica da infecção. A IL-12 parece mais importante para estabelecer do que para manter a resistência dependente de IFN- $\gamma$ . Durante a fase aguda, a produção concomitante de IL-10 regula a produção sistêmica de citocinas tipo-1 e evita lesões potencialmente letais. As citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e não

funções efetoras baseadas em citotoxicidade são críticas para imunidade protetora, tanto na fase aguda quanto na crônica (YAP & SHER, 1999).

Indução de forte resposta IFN- $\gamma$  serve para suprimir a replicação aguda e descontrolada de taquizoítas, assim como para estabelecer e manter a latência durante infecção crônica. Já que o *T. gondii* infecta muitos tipos celulares, é possível que o efeito protetor ocorra através do modelo CIS, via receptor sobre a célula infectada (Figura 8). Uma alternativa possível é que IFN- $\gamma$  ative principalmente macrófagos a secretar metabólitos que atuam em células vizinhas ou sobre parasitas liberados de células infectadas lisadas por células NK ou CTL (linfócitos T citotóxicos), modelo TRANS (YAP & SHER, 1999).

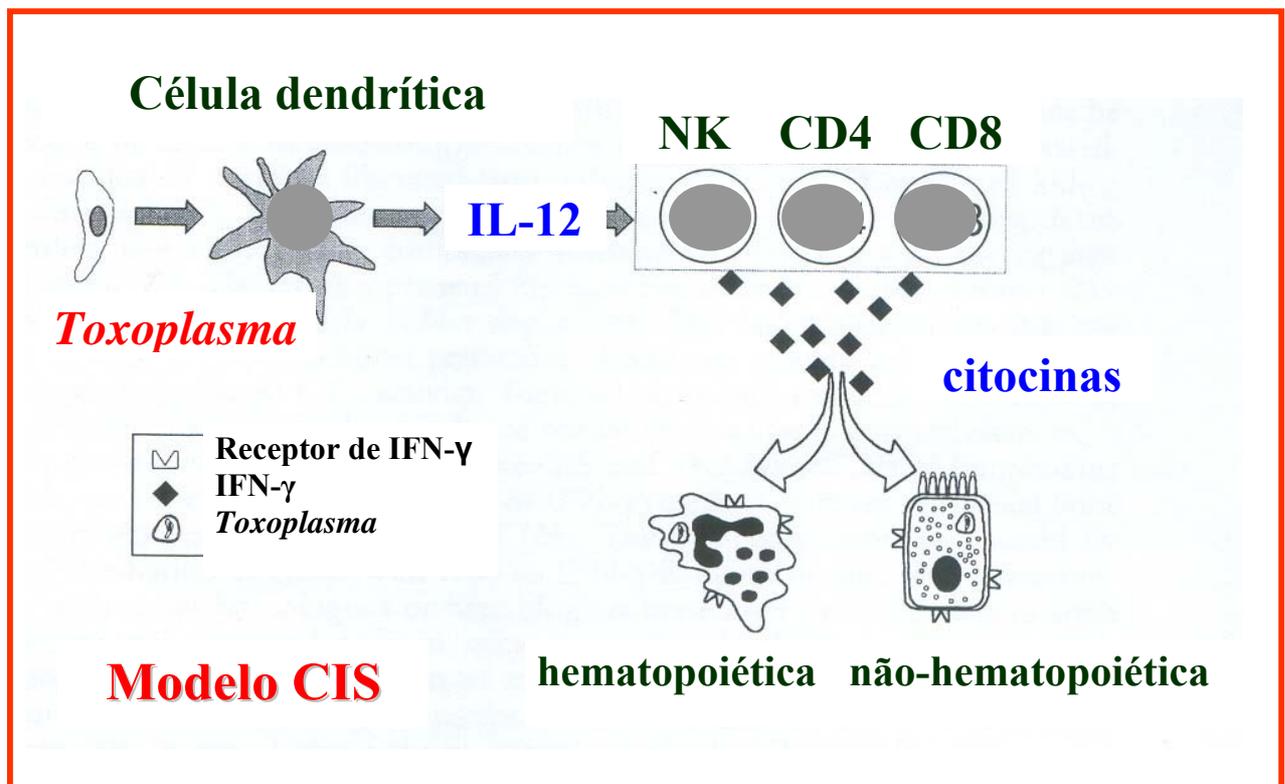


Figura 8 - Análise das vias indutoras e efetoras da resistência mediada pelo IFN- $\gamma$  ao *T. gondii* (YAP & SHER, 1999)

#### 4.1 IMUNIDADE CELULAR

Os mecanismos mais importantes levando à infecção benigna no hospedeiro imunocompetente são mediados por linfócitos T. Tanto linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto T CD8<sup>+</sup> parecem cruciais no desenvolvimento de uma resposta imune eficiente durante infecção. Estudos *in vitro* mostram que após estimulação com antígenos do parasita, tanto linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto T CD8<sup>+</sup> produzem grandes quantidades de IFN $\gamma$ , o maior mediador de resistência contra o parasita, seja em infecção aguda ou crônica (GAZZINELLI et al, 1992; LÜDER & SEEBER, 2001; SUZUKI et al, 1988).

O aumento no sangue periférico dos números absolutos de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células NK, monócitos, e de uma subpopulação de linfócitos T considerada supressora em indivíduos sintomáticos com infecção aguda, não são observados em indivíduos com infecção crônica assintomática (SKLENAR et al, 1986).

Estudos *in vivo* têm mostrado, no entanto, que linfócitos T CD8<sup>+</sup> representam a maior população de linfócitos T com atividade microbicida. Durante a infecção aguda, observa-se que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são menos eficientemente expandidos que os T CD8<sup>+</sup> (LÜDER & SEEBER, 2001).

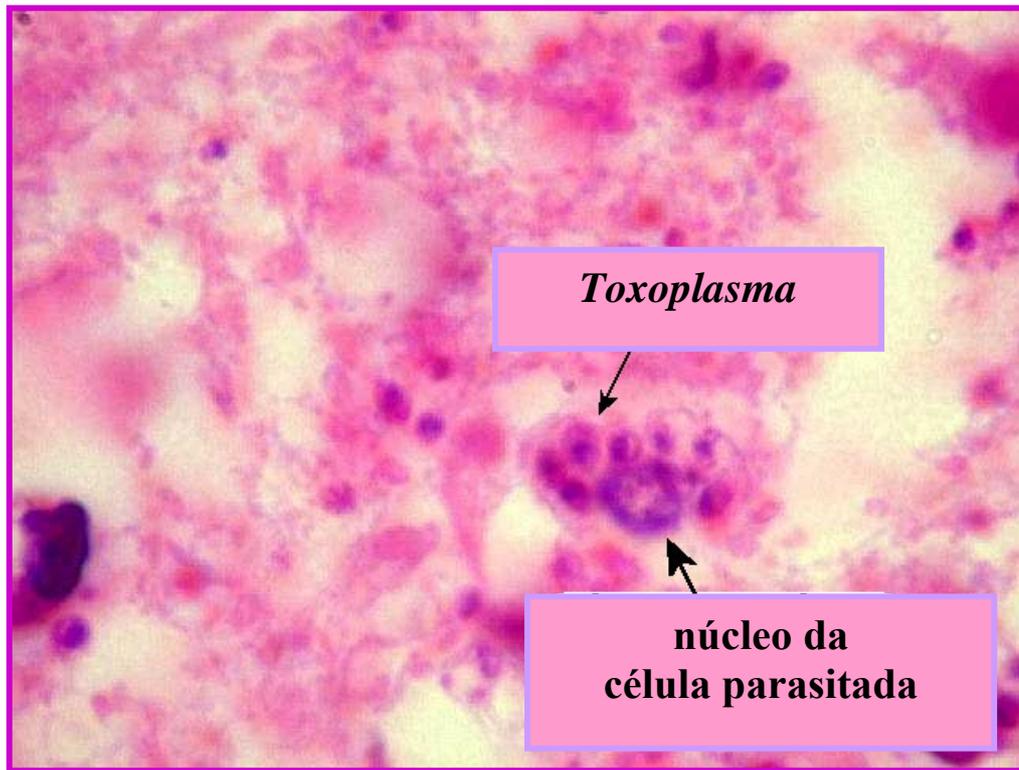


Figura 9: Fagocitose de taquizoítas de *T. gondii*

[www.fcm.unicamp.br/.../anatomia/lamneuro](http://www.fcm.unicamp.br/.../anatomia/lamneuro)

#### 4.2 APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS

Um passo crucial na geração de resposta imune mediada por célula a patógenos intracelulares é a apresentação de antígenos microbianos no contexto MHC (Complexo de Histocompatibilidade Maior) classe I e II. Este tipo de apresentação de antígenos é necessário tanto para iniciar quanto para expandir linfócitos T imaturos e, assim, eliminar eficientemente patógenos intracelulares por mecanismos efetores microbicidas desencadeados pela ativação da imunidade celular. Tanto linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto T CD8<sup>+</sup> reconhecem antígenos apresentados por APCs (células apresentadoras de antígenos) através da interação do TCR (receptor de linfócitos T) com moléculas MHC carregadas de peptídeos estranhos. Em imunologia, antígenos apresentados via MHC classe I são classificados como “endógenos” ou “citosólicos” e via MHC classe II são classificados como “exógenos” ou de “derivação extracelular” (LÜDER & SEEBER, 2001).

As proteínas do *T. gondii* que obtêm resposta T CD4<sup>+</sup> foram caracterizadas como proteínas secretadas pelos parasitas extracelulares, particularmente dos grânulos densos ou dos antígenos de superfície SAG1. Estas proteínas são encontradas em abundância no soro de hospedeiros agudamente infectados. Podem ter acesso às vias de apresentação de antígenos após fagocitose de antígenos do parasita associados com restos de células do hospedeiro infectadas lisadas ou após degradação de parasitas mortos. Diferentes vias de apresentação de antígeno via MHC classe II parecem operar *in vivo* (LÜDER & SEEGER, 2001). Antígenos excretados-secretados (ESA) pelo *T. gondii* são importantes na estimulação do sistema imune do hospedeiro, tanto em infecção aguda, quanto em infecção crônica. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> específicos para ESA (GRA2) ou SAG1 podem estar envolvidos na manutenção da imunidade de longa duração, observada em indivíduos cronicamente infectados (PRIGIONE et al, 2000).

Para que linfócitos T CD8<sup>+</sup> possam ser ativados, é usualmente necessário que macrófagos semelhantes a APCs profissionais ou células dendríticas processem o antígeno. O contato destas células com linfócitos T é capaz de gerar o segundo sinal, co-estimulatório, admitido como necessário para iniciar a divisão celular rápida e a produção de citocinas por linfócitos T. Acredita-se que este estímulo esteja primeiramente restrito a órgãos linfóides, onde a maioria das células T imaturas usualmente residem à espera de estímulo por APCs profissionais.

Existem, no entanto, evidências de que APCs não-profissionais também são capazes de induzir uma resposta T CD8<sup>+</sup>, se forem capazes de alcançar o tecido linfóide secundário. A produção de IFN $\gamma$ , não a atividade citolítica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> tem papel predominante, pelo menos na infecção aguda. No entanto, é obvio que a apresentação de antígenos via MHC classe I é crucial para a sobrevivência do hospedeiro (LÜDER & SEEGER, 2001).

#### 4.2.1 Células apresentadoras de antígenos

O papel do macrófago como célula efetora na geração de citocinas protetoras contra a infecção tem sido reconhecido há quase uma década, mas é surpreendente que pouco se saiba sobre seu papel *in vivo* como célula apresentadora de antígenos do parasita (BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1999).

Células dendríticas são infectadas e prontamente lisadas durante infecção aguda. Em geral, a destruição celular pode aumentar o acesso de antígenos exógenos à via MHC classe I, o que necessita participação de linfócitos T CD4+. Como os linfonodos mesentéricos e o baço são os primeiros órgãos infectados no curso da infecção oral, é possível que a infecção de APCs não-profissionais, junto às profissionais, possam contribuir, em parte, para a rápida indução da resposta T. As APCs não-profissionais, estando no micro-ambiente adequado, dispensariam sinais co-estimulatórios (BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1999).

A elucidação *in vitro* dos mecanismos pelos quais antígenos do parasita entram na via MHC classe I e quais são as APCs responsáveis pela ativação de linfócitos T CD8+ podem ser definidos num futuro próximo, com a manipulação genética do parasita e o auxílio de técnicas moleculares (LÜDER & SEEBER, 2001).

### **4.3 IMUNIDADE HUMORAL**

O papel de linfócitos B na resistência foi estudado em camundongos deficientes em linfócitos B. Estes animais morreram três a quatro semanas após terem sido infectados com cistos, indicando a importância da produção de anticorpos específicos na resistência de camundongos a taquizoítas, especialmente em cérebro e pulmão (KANG, REMINGTON & SUZUKI, 2000).

Na obtenção de resistência a taquizoítas virulentos induzida pela vacina, os linfócitos B foram necessários para a produção de anticorpos que parecem bloquear a infecção de células do hospedeiro conferindo proteção (SAYLES, GIBSON & JOHNSON, 2000).

Estudos recentes sugerem que os linfócitos B podem ter um papel crucial mais tardiamente na infecção, possivelmente inibindo a invasão celular através de anticorpos específicos. A observação de forte resposta tipo  $T_H2$  (subpopulação de linfócitos cooperadores) está relacionada com a liberação de IL-12 e de  $TNF\alpha$  por macrófagos, células NK, eosinófilos e células dendríticas, o que leva à produção de quantidades suficientes de  $IFN\gamma$  por células NK ou T ativadas, cujo objetivo é controlar a infecção aguda. O ajuste da atuação de diversas citocinas é necessário para preservar o delicado balanço entre proteção e dano causado pela resposta inflamatória (LÜDER & SEEBER, 2001).

### **4.4 IMUNIDADE NO FETO E NO RECÉM-NASCIDO**

Tanto feto quanto recém-nascido respondem ao parasita produzindo anticorpos, sendo IgM e IgA essenciais ao diagnóstico neonatal, especialmente quando a gestante fez a infecção aguda durante a gestação e o pré-natal é negativo. A detecção das duas classes de anticorpos identificou 81% dos casos de toxoplasmose congênita, sendo IgA mais freqüentemente

detectada que IgM no nascimento. A presença destes isotipos depende do tempo de soroconversão materna, sendo IgM detectada mais freqüentemente no recém-nascido quando a infecção ocorre no último trimestre. IgM específica é o primeiro anticorpo a ser produzido intra-útero, seguido de IgG e IgA, portanto a IgM pode ter desaparecido e a IgA, produzida mais tardiamente, estar ainda presente no período neonatal. Como reações falso-positivas podem ser observadas no sangue do cordão, a repetição dos testes deve ser feita 10 dias após o nascimento para confirmar a produção de anticorpos pela criança (BESSIÈRES et al, 2001).

Os níveis de IgG específica foram mais elevados nas crianças infectadas do que nas não-infectadas e os níveis mais elevados ocorreram quando as mães se infectaram no 2º trimestre. Os níveis de IgG neonatal, no entanto, não são suficientes para o diagnóstico de infecção congênita. A análise qualitativa da especificidade da IgG por IB e ELIFA pode ser usada para distinguir anticorpos maternos dos fetais. A concentração de IgM total foi significativamente mais elevada nas crianças infectadas, onde foram comuns dosagens superiores a 20 mg/dl. A combinação detecção do parasita e sorologia no período neonatal é melhor do que a utilização isolada das técnicas para Bessières et al (2001).

É necessário continuar o acompanhamento de crianças no pós-natal quando os diagnósticos pré-natal e neonatal são negativos e a mãe fez soroconversão durante a gestação. Os anticorpos maternos usualmente desaparecem entre seis e doze meses de vida. A persistência de IgG após o primeiro ano é sinônimo de infecção congênita (BESSIÈRES et al, 2001).

## **4.5 MODELO EXPERIMENTAL DE TOXOPLASMOSE CONGÊNITA**

Em um modelo experimental para estudar toxoplasmose congênita no rato, observou-se que infecção crônica está associada com imunidade altamente específica, tanto humoral quanto celular, que inicia 10 dias após a infecção. A proliferação de linfócitos T é obtida tanto com extratos crus quanto com antígenos excretados-secretados (ESA), com liberação de IL-2 e INF $\gamma$  por linfócitos ativados.

Imunização de ratos com extratos crus do toxoplasma ou ESA antes da gestação, desencadeia resposta humoral que confere altos níveis de proteção aos recém-nascidos. Este modelo experimental pode auxiliar a identificar vacinas que previnam toxoplasmose congênita (YAP & SHER, 1999). O camundongo BALB/c pode ser modelo para estudos sobre novos agentes terapêuticos (FUX et al, 2000).

## **4.6 MECANISMOS DE “ESCAPE” DO PARASITA**

### **4.6.1 Fusão incompetente do vacúolo parasitóforo**

Os vacúolos parasitóforos contendo *T. gondii* viável não fundem com lisossomos e não acidificam, evitando a degradação do parasita pelas proteases lisossomiais e a geração de peptídeos antigênicos. Como os taquizoítas são suscetíveis ao pH, escapam da morte pela redução do pH intra-vacuolar.

A ingestão de parasitas mortos leva à fusão do fagossoma com o lisossoma e à eficiente degradação do parasita. As vesículas fagocíticas são claramente capazes tanto de fusão quanto de acidificação quando o *T. gondii* opsonizado, recoberto por anticorpos, é ingerido via receptor (fagocitose mediada por receptor), enquanto que a entrada de parasita

viável, não opsonizado, resulta em bloqueio completo da fusão. Uma fusão incompetente do vacúolo parasitóforo contendo parasitas viáveis pode prejudicar a apresentação de peptídeos antigênicos derivados do parasita a linfócitos T CD4+ por APCs infectadas. Pensa-se ser o vacúolo parasitóforo um compartimento especializado, a base molecular para a incompetência da fusão (LÜDER & SEEBER, 2001).

#### **4.6.2 Regulação negativa das moléculas MHC classe II pelo parasita**

O próprio *T. gondii* diminui a expressão de moléculas MHC classe II em algumas APCs experimentalmente infectadas que se tornam incompetentes para interagir e ativar linfócitos T CD4+. A expressão de moléculas MHC classe II e moléculas relacionadas ao *parasita* não parece estar relacionada a um aumento da síntese de IL-10, TGF- $\beta$ , prostaglandina E2 ou NO, citocinas moduladoras ou antagonistas desta expressão. Apesar da interferência do *T. gondii* com a via de apresentação de antígenos MHC classe II, a infecção de indivíduos imunocompetentes induz ativação e expansão de linfócitos T CD4+. A habilidade de evitar a apresentação de antígenos via MHC classe II representa uma vantagem considerável do parasita para a manter a infecção (LÜDER & SEEBER, 2001).

#### **4.6.3 Alteração na apresentação de antígenos via moléculas MHC classe I**

A apresentação de antígenos via MHC classe I pode, também, ser alterada pelo *T. gondii* que prontamente replica em macrófagos ou células dendríticas através do seqüestro de antígenos, protegidos pela membrana vacuolar, uma barreira física potencial de acesso de antígeno ao citosol (LÜDER & SEEBER, 2001).

#### **4.6.4 Seqüestro antigênico**

Não se sabe como os bradizoítas escapam da vigilância imunológica por períodos de

tempo tão longos. Este estágio persiste em cistos derivados da membrana do parasitóforo, com certeza no espaço intracelular. É possível que o seqüestro antigênico através da parede do cisto muito mais espessada, se comparada com a membrana do parasitóforo, é o maior responsável pela evasão de bradizoítas da resposta imune (LÜDER & SEEBER, 2001). As estratégias e mecanismos de sobrevivência do parasita em macrófagos podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 - Estratégias e mecanismos de sobrevivência do parasita em macrófagos (Adaptada de BODGAN & RÖLLINGHOFF, 1999)

<b>ESTRATÉGIAS DE SOBREVIVÊNCIA</b>	<b>MECANISMOS</b>
Geração de ou abrigo em compartimento intra-celular seguro	Inibição da acidificação do vacúolo parasitóforo
Modulação da apoptose	Redução da sobrevivência após infecção
Modulação da produção de citocinas	Indução de citocinas inibidoras, desativadoras de macrófagos, como IL-10, TGF- $\beta$ e supressão ou ausência de indução de citocinas ativadoras (IL-12)
Inibição da apresentação de antígeno e estímulo de linfócito T	Redução da expressão de MHC classe II por macrófago Redução da expressão de moléculas co-estimuladoras por macrófago

## 5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico da infecção pode ser feito por testes sorológicos, por amplificação de seqüências específicas de ácidos nucléicos, por demonstração histológica do parasita ou de seus antígenos e por isolamento. Outros métodos raramente utilizados incluem demonstração de antigenemia, de hipersensibilidade ao parasita (toxoplasmina) e transformação blástica de linfócitos (MONTROYA, 2002).

## **5.1 TESTES SOROLÓGICOS**

São testes que dependem da ligação de antígenos com anticorpos específicos, entendendo-se como antígeno toda a substância capaz de interagir com anticorpo produzido especificamente contra ela. A interação antígeno-anticorpo é um tipo especial de reação química e, como tal, sujeita a vários tipos de força. Há, no entanto, características como especificidade, afinidade e diversidade que permitem caracterizá-la como um tipo particular de reação química (REIS, 1998).

Os testes podem diferir em relação a vários fatores: (a) ao sistema indicador (radioisótopo, fluorescente, quimiluminescente, enzimático com substrato cromogênico, fluorescente ou quimiluminescente), (b) ao modo de fazê-los (artesanal, semi-automatizado ou automatizado), (c) ao tipo de antígeno (fonte e pureza), (d) ao tipo de anticorpo (monoclonal ou policlonal), (e) ao que se pretende identificar (antígeno ou anticorpo, a classe do anticorpo: IgG, IgA, IgM ou IgE), ao modelo técnico (direto, indireto, competitivo, de captura, etc) (REIS, 1998). Testes diferentes freqüentemente medem anticorpos diferentes que possuem padrões próprios de aumento e queda ao longo do tempo após infecção (ASHBURN et al, 1998).

Os primeiros testes solicitados visam a identificação da classe de anticorpos específicos (MONTROYA, 2002) com o objetivo de saber se um indivíduo já foi infectado pelo parasita e, se possível, quando a infecção ocorreu.

### **5.1.1 Imunoglobulina M específica**

A IgM é a primeira classe de anticorpos detectada após infecção primária e o declínio ao longo dos anos é mais rápido do que o da IgG. A pesquisa de IgM iniciou pela IFA indireta, que é subjetiva, pobremente padronizada, depende de equipamento e experiência para interpretá-la. A simples presença de IgM pela IFA era relacionada à infecção aguda, mas as dificuldades quanto à sensibilidade e especificidade da técnica tornam difícil interpretar resultados entre laboratórios (GORGIEVSKI-HRISOHO, GERMANN & MATTER, 1996).

Atualmente existem inúmeros *kits* comerciais para detectar IgM e a sensibilidade é próxima de 100% (ROBERTS et al, 2001). A especificidade em relação a tempo de infecção continua a ser uma preocupação, especialmente na gestante, sendo a maioria dos resultados positivos em índices baixos, "residual", detectada durante a fase crônica da infecção. Além disso, existem *kits* no mercado com um número elevado de resultados falso-positivos. Um resultado positivo em amostra única pode ser interpretado como: (1º) realmente positivo em infecção aguda, (2º) realmente positivo em infecção crônica, (3º) falso-positivo (MONTROYA, 2002).

Os índices de IgM relacionados à infecção aguda são significativamente maiores do que os residuais (WILSON, SCHANTZ & TSANG, 1997), mas medidas quantitativas de diferentes fabricantes não podem ser comparadas por falta de um padrão-ouro. Com o ELFA,

índices crescentes de IgM ou superiores a 3,5 foram observados em infecção aguda, índices entre 3,0 e 3,5 na fase de transição e entre 0,65 e 3,0 em infecção latente (CAMARGO, 2001).

A pesquisa de IgM deve ser feita com um método que apresente reações inespecíficas mínimas como o EIA de captura (CAMARGO, 2001; FERREIRA & CAMARGO, 2002; WILSON, SCHANTZ & TSANG, 1997). Os imunoenaios de captura foram desenvolvidos para solucionar os problemas dos imunoenaios indiretos causados pelo fator reumatóide e pela competição entre IgG e IgM pela ligação aos antígenos do *T. gondii* presos na fase sólida. Os testes de captura, no entanto, também apresentam interferências imunológicas, como: (1ª) o fator reumatóide, usualmente IgM anti-IgG, pode ser “capturado” pela fase sólida e fixar o complexo Ag-Ac pelo fragmento Fc, ocasionando resultados falso-positivos, (2ª) IgG humana específica pode se ligar ao fator reumatóide “capturado” e fixar o complexo antígeno-anticorpo pelo antígeno, (3ª) fatores anti-nucleares, (4ª) auto-anticorpos naturais tanto da classe IgG quanto IgM que possuem um espectro amplo de reatividade, (5ª) presença de IgM anti-HRP por imunização provavelmente de origem alimentar, (6ª) anticorpos heterófilos da classe IgM poli-reativos (anti-Ig e anti-HRP) (TUUMINEN et al, 1999).

A análise dos resultados do *kit* Platelia Toxo IgM revela um número elevado de resultados falso-positivos e assinala a importância de avaliar apropriadamente os *kits* comerciais com testes confirmatórios para determinar se a presença de IgM está associada com infecção recentemente adquirida (LIESENFELD et al, 1996, LIESENFELD et al, 1997).

O algoritmo para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose nos Estados Unidos determina a solicitação da IgM quando se precisa definir tempo de infecção. Se os índices de IgM são elevados, a infecção provavelmente ocorreu nos últimos três a seis meses. Se forem

baixos, podem ser: (a) falso-positivos, (b) relacionados à infecção adquirida nos últimos dois anos ou (c) relacionados à reinfecção. Se forem negativos, a infecção ocorreu há mais de dois anos (WILSON, SCHANTZ & TSANG, 1997).

Para indivíduos com índices baixos de IgM, os autores sugerem a coleta de uma segunda amostra, processando-as simultaneamente para detectar um aumento dos níveis de anticorpos com segurança (WILSON, SCHANTZ & TSANG, 1997). Na gestante com índices baixos de IgM, é difícil determinar tempo de infecção e excluir a possibilidade de transmissão.

A análise do desempenho de *kits* de diferentes fabricantes por Naessens et al. (1993), mostrou que para IgM, cinco EIAs: (a) Abbott, (b) Behring, (c) Biomérieux, (d) Organon e (e) Pasteur, tiveram bom desempenho, ao contrário dos kits do laboratório Hybritech e, em menor extensão, do laboratório Clark.

A Fundação Médica de Palo Alto e o Center for Disease Control and Prevention examinaram o desempenho de *kits* comerciais para a detecção de IgM específica anti-*T. gondii* utilizando como padrão-ouro uma bateria de testes (ELISA-M duplo sanduíche e EIA de captura para IgM; Sabin-Feldman DT e IFA indireta para IgG). Os *kits* comerciais analisados e os resultados obtidos quanto à sensibilidade e especificidade foram: Abbott-M IMx versão 1: 100% e 77,5% e versão 2: 93,3% e 97,3%, Abbott Toxo-IgM EIA: 100% e 84,2%, BioMérieux Vitek VIDAS IgM: 100% e 98,6%, BioWhittaker Toxo-cap IgM: 100% e 95,9%, Gull Toxo IgM: 97% e 85,6% e Sanofi Toxo IgM: 100% e 96,8% (WILSON et al, 1997).

A definição do antígeno a ser usado para detectar anticorpos presentes apenas na infecção aguda poderia melhorar a especificidade dos testes para IgM. Um ELISA-IgM que utiliza o antígeno de superfície p35 presente em taquizoítas foi testado em três grupos de gestantes classificadas pela história clínica e pelo perfil sorológico: (1º) infecção recente: 20 gestantes, (2º) infecção passada: 33 gestantes e (3º) persistência de IgM: 16 gestantes. O ELISA foi positivo em 18 gestantes do primeiro grupo, em quatro gestantes do segundo grupo, sendo negativo nas gestantes do terceiro grupo (SUZUKI et al, 2000).

O acompanhamento de 446 gestantes infectadas pelo *T. gondii* para determinar a média e a duração da IgM positiva pela IFA indireta e pelo ISAGA mostrou que uma minoria de mulheres permanece positiva por dois anos, 9,1% pela IFA e 27,1% pelo ISAGA. Variações na duração da resposta IgM para precisar tempo de infecção limitam o seu uso em gestantes (GRAS et al, 2004).

### **5.1.2 Imunoglobulina G específica**

Inicia a ser detectada usualmente duas semanas após infecção quando níveis baixos, entre 6 e 20 UI/ml podem ser observados no teste do corante de Sabin Feldman. Os níveis mais elevados são detectados em um a dois meses, seguindo-se um longo declínio ao longo dos anos. Alguns indivíduos nunca atingem, no entanto, níveis de IgG iguais ou superiores a 300 UI/ml durante infecção aguda, e podem ser erroneamente diagnosticados como tendo infecção crônica (JENUM, STRAY-PEDERSEN & GUNDERSEN, 1997). Soros com IgG específica reconhecem um número maior de determinantes antigênicos do parasita do que os que apresentam tanto IgG quanto IgM, indicando um amadurecimento desta classe de anticorpos ao longo do tempo (SUSANTO & MULJONO, 2001).

Existem diferentes métodos para detectar IgG. O DT descrito por Sabin e Feldman em 1948 é considerado referência para IgG. É artesanal e utiliza trofozoítas livres, o que levou à sua substituição pela IFA indireta em 1964. A IFA expressa os resultados pela maior diluição do soro positiva ou em UI/ml em relação a soro-padrão da Organização Mundial da Saúde. Este avanço permitiu a identificação das diferentes classes de imunoglobulinas. (CAMARGO, 2001).

As limitações da IFA indireta, de leitura subjetiva, são consideráveis em grandes rotinas. As medidas quantitativas de IgG são pobremente comparáveis em resultados de diferentes laboratórios e, mesmo, do mesmo laboratório, apesar de rigoroso controle interno. Para que os aumentos de títulos possam ser valorizados, é necessário que as duas amostras do paciente sejam processadas simultaneamente (WILSON, SCHANTZ & TSANG, 1997).

IgG específica por ELISA tem ótima sensibilidade, sendo especialmente útil na triagem. Produz tipicamente resultados mais elevados do que o DT, do que a aglutinação direta ou do látex, o que reflete diferenças quanto ao perfil de antígenos utilizados em cada teste (HOLLIMAN et al, 1994).

A análise do desempenho de *kits* de diferentes fabricantes por Naessens et al. (1993), mostrou, que para IgG, todos os testes tiveram bom desempenho quando usados para definir imunidade e ausência de imunidade, mas variaram quando a imunidade era questionável. IgG pelo Axsym® (Abbott) mostrou-se mais sensível que o VIDAS® (bioMérieux) em soroconversão quando comparado à IFA indireta e ao ISAGA (GOUBET et al, 1999).

Poucos antígenos do *T. gondii* têm sido caracterizados molecularmente e expressos como proteínas recombinantes (REDLICH & MÜLLER, 1998). Quatro antígenos recombinantes, rP22, rP25, rP29 e rP35, foram utilizados no “Com. ELISA”, para melhorar a distinção entre infecção recém-adquirida e passada. Dezoito de 20 (90%) mulheres com perfil de infecção aguda foram positivas e 69 de 70 (98,6%) com perfil de infecção crônica foram negativas com o teste (LI, MAINE, SUZUKI et al., 2000). O antígeno recombinante Rop 2 obtém forte resposta humoral no início da infecção podendo ser útil em sistemas diagnósticos em combinação com outros antígenos do parasita para detectar anticorpos das classes IgG, IgA e IgM (MARTIN et al, 1998).

O antígeno recombinante do grânulo denso do taquizoíta, GRA6-GST mostra especificidade de 99,6% para discriminar infecção recente de infecção passada. O antígeno GR6 está presente apenas durante a fase de divisão de taquizoítas e de invasão das células do hospedeiro, portanto, anticorpos contra este antígeno devem atingir níveis elevados no início da resposta imune. Desaparecem, em média, em oito semanas, trazendo informações adicionais em pacientes com persistência de IgM (REDLICH & MÜLLER, 1998).

A busca de anticorpos presentes apenas na infecção aguda pode melhorar os testes diagnósticos, levando à utilização de diferentes antígenos, sozinhos ou em combinações, como p35, p38, rP22, rP25, rP29, rP3, Rop 2 e GRA6 (LI, MAINE, SUZUKI et al., 2000; LI, GALVAN, ARAUJO et al, 2000; MARTIN et al, 1998; MARCOLINO et al, 2000). Anticorpos da classe IgG contra p35 são produzidos durante infecção aguda, mas são incomuns na fase latente ou crônica e podem ser um marcador sorológico útil para diferenciar infecção recente, de adquirida em passado distante (LI, MAINE, SUZUKI et al).

Antígenos recombinantes foram utilizados por Buffolano et al. (2005) para melhorar o diagnóstico sorológico da toxoplasmose congênita em 104 crianças cujas mães tiveram toxoplasmose aguda durante a gestação, das quais 35 foram infectadas e destas 22 foram assintomáticas no período neonatal. IgM, IgG e subtipos de IgG contra epítomos dos fragmentos do MIC2, MIC3, MIC4, A2AP, AMAI e produtos do gene SAG, foram medidos por ELISA. Crianças infectadas reconheceram um repertório de antígenos maior do que crianças não infectadas. Com duas coletas seriadas obtidas nos três primeiros meses de vida, foi possível demonstrar neossíntese de IgG anti-MIC2 e anti-SAG1, principalmente de IgG2 em 13 das vinte crianças com toxoplasmose congênita. A IgM das crianças infectadas reagiu, pelo menos, com um antígeno recombinante, a partir dos dois meses. Para os autores, o uso de antígenos recombinantes pode melhorar o diagnóstico da toxoplasmose congênita.

### **5.1.3 Imunoglobulina A específica**

A pesquisa de IgA específica por diferentes métodos foi considerada uma alternativa ou complemento à pesquisa de IgM no diagnóstico de infecção aguda ou de infecção congênita.

Bessières et al. (1992) quantificaram IgA e IgM específicas por teste de captura em 260 casos de toxoplasmose adquirida, 94 fetos com suspeita de toxoplasmose congênita e 30 crianças infectadas, encontrando IgA em 95% dos casos de toxoplasmose adquirida e em 75% dos casos de toxoplasmose congênita. Em alguns casos, a IgA persistiu por mais de 24 meses após o nascimento. A sensibilidade da IgM foi de 61%. Nos fetos infectados, IgA e IgM foram detectadas no sangue fetal a partir da 24<sup>a</sup> semana.

Se realizada por imunocaptura, a IgA, é útil no diagnóstico de infecção congênita, tanto no feto quanto no recém-nascido (BESSIERES et al, 1992), e de infecção aguda (ASHBURN et al, 1998; BESSIÈRES et al, 2000), mas pode persistir por um ano ou mais (COZON et al, 1998; FRANCIS & JOYSON, 1993; GORGIEVSKI-HRISOHO, GERMANN & MATTER, 1996), o que também limita sua utilização em gestantes (GORGIEVSKI-HRISOHO, GERMANN & MATTER, 1996).

#### **5.1.4 Imunoglobulina E específica**

IgE negativa exclui infecção aguda quando é utilizado o ISAGA-IgE (ASHBURN et al, 1998). Pode persistir, também, por um ano ou mais após infecção aguda (COZON et al, 1998; WONG et al, 1993).

#### **5.1.5 Antigenemia**

Pode ocorrer por um espaço de tempo curto, tanto em infecção primária quanto em reativação. Em camundongos infectados experimentalmente, antigenemia pode ser detectada 48 horas após infecção e atingir concentrações máximas em torno de 10 dias (SUSANTO & MULJONO, 2001). Porém, pela transitoriedade e inconstância, sua pesquisa é de pouco valor diagnóstico (CAMARGO, 2001).

#### **5.1.6 Comparação de *kits* comerciais e de *kits in house***

É muito importante ter um bom conhecimento sobre as características do teste usado no laboratório. É necessário saber se o teste em particular tem uma tendência a apresentar níveis mais elevados ou mais baixos de IgG e como evoluem os níveis de IgG e de IgM com o tempo. A sensibilidade e a especificidade da IgM também devem ser conhecidas. Não é boa prática mudar de um teste para outro. Se está sendo considerada uma mudança, esta deve ser

feita após uma avaliação cuidadosa do novo teste, para que se obtenha familiaridade com as propriedades do mesmo. “O melhor teste será apenas adequado se o laboratório for incapaz de analisar corretamente os resultados; um teste aceitável pode ser extremamente útil num laboratório que tenha grande experiência com o mesmo (NAESSENS et al, 1993).”

O sistema ELFA VIDAS bioMérieux foi comparado ao sistema EIA Abbott tendo a IFA como referência para IgG e o ISAGA para IgM, em 594 amostras e em 15 soroconversões ou infecções recentes (39 amostras). A sensibilidade e a especificidade do ELFA-G foram de 99,7% e 99,4% e do ELFA-M de 100% e 97% respectivamente. O ELFA detectou IgG e IgM mais precocemente do que o EIA. ELFA-M foi menos específico, mas muito mais sensível do que EIA-M durante infecção primária (PELLOUX et al, 1993).

O MEIA Abbott foi comparado ao DT e ao ELISA-IgM em 398 amostras previamente testadas e 1.000 amostras consecutivas. Uma bateria de testes (IgA, IgE e AC/HS) foi utilizada para esclarecer as discordâncias. De 21 amostras MEIA-M positivas, ELISA-M negativas, 19 eram de infecção passada; de oito amostras ELISA-M positivas, MEIA-M negativas, cinco eram de infecção passada e de 55 amostras positivas em ambos os testes, 21 eram compatíveis com infecção passada (LIESENFELD et al, 1996).

Seis testes foram analisados após infecção primária em 27 gestantes: DT, Platelia-G (EIA), Platelia-M (EIA), Platelia-A (EIA), ISAGA-M e Toxo-Screen DA IgG. Os testes mostraram grande variação individual quanto aos níveis superiores observados e também quanto ao espaço de tempo necessário para atingí-los (DT: 2 a 21 semanas, Platelia-G: 4 a 36 semanas, Platelia-M: 2 a 18 semanas, Platelia-A: 2 a 21 semanas, ISAGA-M: 1 a 6 semanas e Toxo-Screen DA IgG: 4 a 30 semanas). Os mais sensíveis no início da infecção foram o DT e

os que medem IgM. Todas as amostras coletadas entre 21 e 52 semanas pós infecção, exceto uma, foram positivas para IgG, 80% foram positivas para IgM e 45% para IgA. Devido à grande variação individual, parece impossível estimar quando a infecção ocorre em amostra isolada e prever um aumento de nível em amostras pareadas, a menos que a primeira seja marginalmente positiva. Como critério diagnóstico, um nível superior a 300 UI/ml no DT teve a menor sensibilidade para infecção aguda (JENUM & STRAY-PEDERSEN, 1998).

A avaliação do diagnóstico imunológico pós-natal da toxoplasmose congênita foi realizada em 50 crianças com persistência de IgG após 12 meses, filhas de gestantes com soroconversão documentada durante a gestação. Os métodos utilizados foram o ELIFA ou IB para IgG ou IgM em relação a um EIA-M comercial (BioRad-Pasteur) ou ISAGA para IgM ou IgA. O desempenho de combinações de testes também foi avaliado. A sensibilidade cumulativa em um ano do ELIFA associado ao ISAGA foi de 98%. Somente um caso de toxoplasmose congênita foi perdido pela combinação ELIFA e ISAGA. Três casos foram perdidos pela combinação IB e ISAGA, sendo considerada a possibilidade do tratamento ter inibido a neoformação de anticorpos. Desempenho similar foi obtido pela combinação ELIFA ou IB associado ao EIA. Não houve diferença significativa quanto ao desempenho das combinações ELIFA/ISAGA e IB/ISAGA. Os autores concluem que ambas as combinações podem ser usadas para o diagnóstico da toxoplasmose congênita no recém-nascido (PINON et al, 2001)

A combinação da avidéz de IgG e WB por Marcolino et al. (2000) permitiu identificar a p38 como um marcador antigênico ótimo de baixa avidéz no diagnóstico de toxoplasmose aguda devido à significativa diminuição da sua freqüência (de 80 a 0%) após tratamento com uma solução de uréia 6M. Anticorpos das classes IgM e IgA anti-*Toxoplasma* foram também

avaliados em amostras obtidas em papel filtro, com um teste imunofluorométrico automatizado, o AutoDELFA, que utiliza antígeno purificado ligado a europium. Os resultados foram calculados com base no soro de referência - WHO Third International Reference Serum. A nova técnica foi primeiro avaliada para IgM em relação a um ensaio de captura para IgM *in-house*. Prospectivamente foram analisadas 69.467 amostras e identificados 24 recém-nascidos que tiveram posteriormente o diagnóstico de toxoplasmose congênita. Nenhum caso foi detectado somente pela IgA (SORENEN et al, 2002).

### **5.1.7 Testes propostos como alternativa por terem maior sensibilidade e/ou especificidade em situações específicas**

#### **ELIFA (enzyme-linked immunofiltration assay)**

O ELIFA é um procedimento de co-imunodifusão. Um antígeno solúvel do *Toxoplasma* e três amostras séricas (15µl cada) migram em membrana de acetato microporosa por três horas. Os arcos de precipitação são revelados por imunofiltração de anti-IgG total marcada com peroxidase. O substrato revela os arcos de precipitação. A interpretação consiste em comparar os arcos detectados nos soros da mãe e do recém-nascido. O achado de anticorpos na criança, não observados na mãe, evidencia a síntese de anticorpos pelo feto. ELIFA anormal ou positivo indica infecção congênita (PINON et al, 1985).

ELIFA e sorologia convencional foram realizados em 88 crianças cujo critério diagnóstico de toxoplasmose congênita foi a persistência ou não da IgG aos 12 meses (Figura 10). A sensibilidade e a especificidade do ELIFA em relação à presença de IgM neonatal foram de 94,1 e 88,8% respectivamente e em relação à presença de IgA neonatal foram de 98,6 e 81,4% respectivamente (ZUFFEREY et al, 1999).

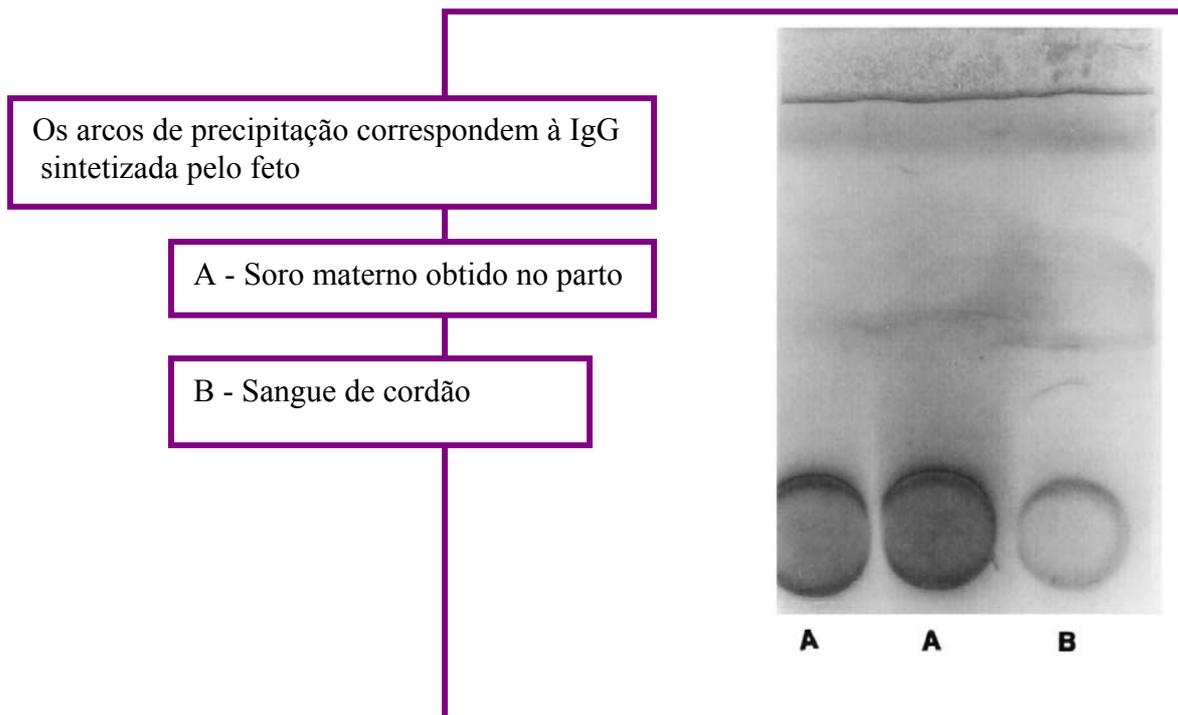


Figura 10 - Padrões indicativos de toxoplasmose congênita (ZUFFEREY, 1999)

#### **ISAGA** (immunosorbent agglutination assay)

O ISAGA é uma técnica descrita por Desmonts, Naot e Remington (1981) em que placas de microtitulação rígidas com fundo em U são cobertas com anti-IgM. O soro do paciente em diluições crescentes é depositado sobre as cavidades e incubado a 37° C, o que permite a captura de IgM e elimina a IgG específica. O passo seguinte é o depósito de uma suspensão de taquizoítas. A leitura da aglutinação permite expressar o título da amostra, a diluição mais alta do soro com forte (+++) aglutinação. Esta técnica permite, também, a detecção de outras classes de anticorpos por captura e tem grande sensibilidade para IgM, IgA e IgE. ISAGA-IgA é sensível e detecta soroconversão, ISAGA-IgE associado à avidez confirma infecção aguda, IgE negativa a exclui (ASHBURN et al, 1998).

#### **WB** (Western blotting)/ **IB** (Immunoblot)

É um procedimento em que as proteínas são separadas pelo tamanho por eletroforese e, após separação, transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde ficam imobilizadas. Esta membrana “sensibilizada” é utilizada como suporte sólido para a detecção de anticorpos específicos para diferentes antígenos. A “revelação” da presença de anticorpos é feita, usualmente, por ensaio imunoenzimático com substrato cromogênico (REIS,1998).

A análise dos marcadores moleculares de infecção aguda por avidéz de IgG e WB revelou que as bandas reconhecidas por IgG são: p16, p32, p40, p43, p54, p60, p66 e p97. A p38 está relacionada à baixa avidéz podendo ser um marcador de infecção aguda, ao contrário da p30 (MARCOLINO et al, 2000).

O Imunoblot-PHAST-SYSTEM foi realizado em 48 casos, 27 com toxoplasmose congênita comprovada e 21 sem comprovação, em amostras obtidas nos períodos pré e pós-natal. Permitiu a comparação dos padrões e a determinação da origem dos anticorpos, se transmitidos pela mãe ou neosintetizados pelo feto ou pela criança. Os resultados foram comparados a outros métodos, IgG: IFA indireta e ELISA; IgM: ISAGA, ELISA de captura e IFA; também ao ELIFA, à cultura e à inoculação em camundongo. No diagnóstico pré-natal e neonatal, teve um desempenho pelo menos igual ao dos outros testes e no período pós-natal permitiu o diagnóstico mais precoce do que com o ELIFA (CHUMPITAZI et al, 1995).

O teste CGMC (Figura 11) é um imunoblot útil no diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita que compara os perfis da IgG materna e da criança ao nascimento e em três meses. Qualquer banda presente no soro da criança e ausente no soro materno é diagnóstica (GROSS et al, 2000).

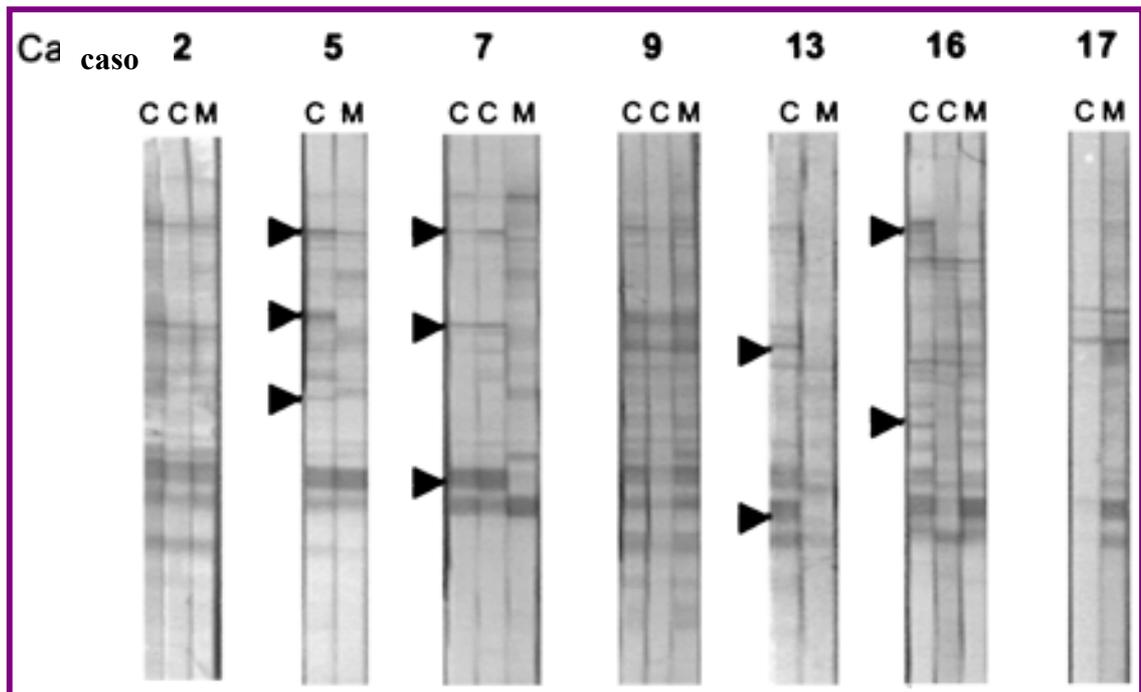


Figura 11: CGMC, exemplo representativo dos perfis de IgG da mãe (M) e da criança (C). As flechas assinalam a reatividade de anticorpos no soro da criança a antígenos do *Toxoplasma* ausentes no soro materno (GROSS et al, 2000)

### **Dot-ELISA**

Antígenos de taquizoítas foram utilizados em Dot-ELISA para avaliar a avidéz de IgG no diagnóstico da toxoplasmose em dois grupos de soros: (1º) cinco soros obtidos nos dois primeiros meses e (2º) cinco soros obtidos após 12 meses ou mais do início de linfadenopatia. O teste é rápido, não necessita aparelhagem sofisticada e foi capaz de discriminar infecção recente de infecção passada nas 10 amostras (MELLO & ROSSI, 1997).

### **5.1.8 Categorias para infecção primária em gestantes imunocompetentes**

As categorias para infecção primária em gestantes imunocompetentes foram assim definidas pelo European Research Network on Congenital Toxoplasmosis (LEBECH et al, 1996): (1ª) Definitiva: evidência de soroconversão na gestante ou cultura positiva em sangue materno; (2ª) Provável: (a) evidência de soroconversão nos dois meses que antecederam a gestação ou (b) aumento significativo nos títulos de IgG, presença de IgM e/ou IgA e início de linfadenopatia durante a gestação ou (c) altos títulos de IgG e presença de IgM e/ou IgA na segunda metade da gestação; (3ª) Possível: (a) IgG elevada e presença de IgM ou IgA na primeira metade da gestação ou (b) níveis altos e estáveis de IgG sem IgM na segunda metade da gestação; (4ª) Improvável: níveis baixos e estáveis de IgG com ou sem IgM ou níveis altos de IgG sem IgM no início da gestação; (5ª) Não-infectada: soronegativa ou amostra materna soropositiva pré-concepção ou IgM e/ ou IgA positiva sem IgG.

A definição das categorias de Lebech et al. (1996) não considera que os níveis de IgG diferem entre kits de diferentes fabricantes. A comparação entre os sistemas VIDAS (ELFA) e AxSYM (MEIA) mostrou ser o MEIA mais sensível do que o ELFA em infecção primária e o ELFA 2,9 vezes mais elevado em infecção latente (REIS et al, 2003 c).

### **5.1.9 Confirmação da sorologia convencional**

Existem muitas gestantes classificadas nas categorias infecção provável ou possível, se considerarmos os resultados da sorologia convencional. Nenhum teste único é ideal (ASHBURN et al, 1998).

### **Perfis sorológicos**

Camargo (2001) define três perfis sorológicos na evolução da toxoplasmose em relação à presença e ao desaparecimento dos anticorpos específicos, que obedecem a ritmos individuais: (a) perfil I ou de toxoplasmose recém-adquirida: soroconversão ou, ainda na vigência de parasitemia, IgG de baixa avidéz, IgM, IgA e IgE; (b) perfil II ou de transição: níveis elevados de IgG com avidéz crescente; se outros isotipos estiverem presentes, os níveis são baixos e (c) perfil III ou de infecção latente ou crônica: IgG de baixos níveis com alta avidéz, ausência de outros isotipos. Este perfil mantém-se por toda a vida.

Interpretações errôneas dos testes podem levar à indicação de abortamento em fetos sem nenhum risco ou a condutas negligentes em fetos que estão em grande risco ou já infectados (LEÃO, 2002). Por técnicas de grande sensibilidade, IgA, IgM e IgE podem persistir por um ano ou mais pós-infecção aguda. A maioria dos casos de avidéz baixa é relacionada à infecção passada para COZON et al. (1998), portanto, a estratégia sorológica ideal em gestantes precisa, ainda, ser definida (ASHBURN et al, 1998).

### **TSL-PAMFRI (*Toxoplasma* Serological Profile-Palo Alto Medical Foundation Research Institute)**

Para precisar melhor tempo de infecção na gestante, o laboratório de referência do CDC e do FDA considera necessário utilizar um painel de testes, o TSP-PAMFRI, que consiste dos seguintes testes: (a) DT, (b) ELISA IgM duplo sanduíche, (c) ELISA IgA, (d) ELISA IgE e (e) teste AC/HS (MONTROYA, 2002).

O teste AC/HS utiliza a aglutinação com taquizoítas fixados pela formalina (HS) e com taquizoítas fixados pela acetona (AC). É interpretado comparando-se os títulos da IgG na amostra, resultantes da habilidade em reconhecer taquizoítas fixados com AC e com HS.

Segundo o autor, em amostras IgG e IgM positivas, o poder discriminatório do TPS para diferenciar infecção recém-adquirida de infecção crônica é provavelmente superior a qualquer outro teste sorológico.

Interpretações do TSP-PAMFRI: (a) perfil de infecção passada: soro DT positivo; IgM, IgA e IgE negativas; (b) perfil altamente sugestivo de infecção recente: soro com altos títulos no DT; IgM, IgA e IgE positivas e um padrão “agudo” no AC/HS, (c) perfil inconclusivo: DT positivo; IgM positiva, IgA e IgE presentes em títulos baixos ou equívocos e a AC/HS também equívoca. Nesta situação, uma segunda amostra é solicitada e os resultados das duas amostras são comparados. Quando os títulos não se alteram significativamente, a infecção é considerada passada; se há aumento ou declínio nos títulos, a infecção é considerada recente (MONTROYA, 2002).

### **Avidez de IgG**

Introduzida por Hedman et al. (1989), baseia-se na força de ligações iônicas da IgG com um antígeno multivalente. No início da resposta imunológica, a IgG produzida frente a um estímulo antigênico tem baixa avidéz mas, à medida que o tempo passa, a avidéz aumenta. A IgG produzida na fase aguda liga-se com menor avidéz ao parasita do que a IgG produzida na fase de convalescença. Avidéz baixa para os autores é um forte indicador de infecção primária materna em uma única amostra.

Avidéz baixa foi apontada, também, como um forte indicador de infecção primária materna numa única amostra por Lappalainen et al. (1995). Os autores estendem o diagnóstico de infecção aguda a gestantes IgM positivas com baixa avidéz recomendando o PCR no líquido amniótico para verificar se houve infecção fetal.

A avidéz começou a ser utilizada como um segundo teste em amostras de gestantes IgG e IgM positivas (AUER et al, 2000; COZON et al, 1998; LOGAR, NOVAK-ANTOLIC & ZORE, 1999; LIESENFELD et al, 2001; PRATLONG, 2002; PUJOL-RIQUÉ et al, 2000). Sensini et al (1996) observaram que sua maturação pode ser retardada por drogas anti-parasitárias.

Para Jenum, Stray-Pedersen e Gundersen (1997), de 92 amostras IgM positivas com níveis de IgG superiores a 300 UI/ml, sugestivas de infecção recente, 72,8% têm avidéz superior a 20%, indicando que a infecção é de mais de 20 semanas. Introduzindo alta avidéz como critério de exclusão de infecção aguda, muitas gestantes serão poupadas de exames desnecessários, tratamento e ansiedade. A persistência de IgM e de IgG de baixa afinidade em algumas mulheres infectadas sugere que a resposta imune possa ser mais demorada nestes casos (JENUM, STRAY-PEDERSEN & GUNDERSEN, 1997).

Pelloux et al. (1998) avaliaram 356 soros, incluindo 42 soros seqüenciais obtidos de soroconversão em gestantes, com uma adaptação do sistema VIDAS bioMérieux, usando uréia 6M como agente de dissociação, e concluíram que um índice de avidéz superior a 0,3 permitiu excluir infecção recente nos quatro meses que precederam a coleta. Avidéz alta excluiu infecção recente em 59 casos, 34 com ELFA-IgM positiva na série de Auer et al (2000).

Na série de Cozon et al (1998), toxoplasmose aguda foi excluída em 329 de 493 soros, utilizando o valor *cut-off* para avidéz de 35%. Em 99 amostras de 77 gestantes com infecção crônica e níveis baixos e estáveis de IgG e IgM, 35 amostras tinham avidéz entre 30-34%, 34

entre 25-29%, 16 entre 20-24% e 14 entre 11-19%. Baixa avidéz foi relacionada à infecção crônica em 60% dos casos, o que reduz seu valor para diagnóstico de infecção aguda segundo os autores. O índice de avidéz relacionado a tempo de infecção neste trabalho pode ser, no entanto, questionado.

A avidéz foi sugerida para distinguir toxoplasmose ocular por reativação de infecção congênita, de infecção recém-adquirida em indivíduo imunocompetente. Baixa avidéz nem sempre está relacionada à infecção recém-adquirida, mas alta avidéz pode excluí-la nos cinco meses precedentes (PAUL, 1999).

Resultados quantitativos de IgG, IgM e avidéz de IgG pelo sistema VIDAS foram analisados em 64 amostras IgG e IgM positivas, sendo 32 de 12 indivíduos infectados nas últimas 40 semanas (grupo 1) e as restantes de 17 indivíduos infectados há mais de 40 semanas (grupo 2). Um índice de IgM inferior a 1,05 foi associado com infecção há mais de 12 semanas e um índice de avidéz superior a 0,164 excluiu 100% das infecções com 12 ou inferiores a 12 semanas. Índices de avidéz maiores de 0,26 excluíram infecções nas 20 e de 0,45 nas 40 semanas precedentes. O sistema VIDAS identificou corretamente IgM residual, evitando nova coleta para analisar a cinética da IgG na gestante (PUJOL-RIQUÉ et al, 2000).

Liesenfeld et al. (2001) avaliaram a avidéz em 125 amostras de gestantes no primeiro trimestre da gestação com sorologia inconclusiva (IgM ou aglutinação diferencial) quanto à possibilidade de infecção recém-adquirida. De 93 gestantes IgM positiva ou equívoca, 52 (55,9%) tinham alta avidéz. De 87 gestantes (69,6%) aglutinação diferencial “positiva” ou equívoca, 35 (40%) tinham alta avidéz. Os resultados assinalam o valor da avidéz alta em amostras obtidas no início da gestação.

Montoya et al. (2002) avaliaram o kit VIDAS no laboratório de referência Palo Alto Medical Foundation Research Institute, nos EU. Soro de 132 gestantes com até 16 semanas de gestação foram escolhidos porque pelo menos um teste do TSP sugeria ou era equívoco para infecção recém-adquirida. Alta avidéz foi demonstrada em 75% dos 99 soros com IgM positiva pelo ELISA e 31,3% de 16 soros com TSP de infecção aguda. Uma percentagem significativa de soros com resultados IgM ou TSP equívocos também demonstrava alta avidéz. De 39 gestantes em tratamento com espiramicina, 19 (48,7%) tinham alta avidéz. Os autores salientam a importância da avidéz associada ao TSP para excluir infecção recente, especialmente quando se dispõe de uma única amostra. Para Pratlong (2002), a avidéz excluiu infecção recente na maioria das amostras IgM positivas em gestantes. É o teste complementar mais usado correntemente em gestantes IgG e IgM positivas.

Na série de Flori et al. (2004), o aumento dos índices de avidéz foi lento; o tempo médio para alcançar o limiar 0,3 foi de 14,2 meses. Nenhuma mulher atingiu este limiar nem aos quatro, nem aos seis meses após soroconversão. De acordo com os autores, é justificável diminuir o limiar para excluir uma infecção recente de menos de quatro meses para 0,2 e usar o limiar de 0,3 do fabricante para excluir infecções de mais de seis meses. A cinética do teste de avidéz em cinco grupos de mulheres quanto ao tipo e à duração do tratamento também foi avaliada e não houve diferenças significativas quando comparações foram feitas entre os grupos.

#### **5.1.10 Prevenção da toxoplasmose congênita: novas perspectivas**

O desempenho de 20 testes isolados e de 195 combinações foi avaliado em 20 centros de referência europeus utilizando um painel com 276 soros: 73 de pacientes com infecção aguda, 49 de pacientes convalescentes (soroconversão entre três e 12 meses) e 154 de pacientes com infecção passada (soroconversão há mais de um ano). Como os testes de alta sensibilidade apresentam baixa especificidade, nenhum método isolado pode distinguir os diferentes estágios da infecção. No entanto, excelente desempenho foi obtido com o uso seqüencial de um teste de grande sensibilidade, como a maioria dos testes analisados para IgM, seguido de um teste que explora a qualidade da IgG, como os testes específicos de estágio: a aglutinação diferencial (AC/HS) e a avidéz. Neste estudo, as melhores combinações foram obtidas com IgM associada à AC/HS ou à avidéz, que atingiram especificidades diagnósticas clínicas de cerca de 99%, mantendo sensibilidade igual ou superior a 95% (ROBERTS et al, 2001). Para os autores, tal poder não tem precedentes em relação a um único método e abre novas possibilidades na prevenção da toxoplasmose congênita.

As infecções em gestantes classificadas pelo critério do European Network on Congenital Toxoplasmosis pelos participantes do TOXO-NET na Itália foram reclassificadas após a realização da avidéz em “definição de caso”, “infecção provável” e “infecção improvável”. Em 117 casos assim reclassificados, 77 (65,8%) poderiam ser definidos pela avidéz em uma única amostra (ZOTTI et al, 2004).

Para Suzuki et al (2001), a avaliação dos marcadores sorológicos no imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda aponta as limitações da detecção de anticorpos das classes IgA, IgE e do teste de aglutinação diferencial. A avidéz pelo método de titulação revelou-se o mais acurado neste estágio da infecção.

## 5.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

O teste PCR iniciou a ser utilizado na década de 1980, com a descoberta da Taq-polimerase resistente à alta temperatura. Nesta técnica, o DNA-alvo, se presente na amostra, é amplificado pela DNA-polimerase. A região a ser amplificada é delimitada por par (es) de polinucleotídeos específicos ou *primers* (REIS, 1998). Mesmo em número extremamente reduzido na amostra, o *Toxoplasma* pode ser identificado pela detecção de segmentos característicos de ácidos nucleicos, depois de amplificados por PCR, em menos de 24 horas. Assim, vários segmentos característicos do DNA do parasita podem ser amplificados para a identificação, correspondentes a diferentes genes (CAMARGO, 2001). Entre os genes-alvos utilizados encontramos: B1, p30, rDNA, 18SrDNA TGR (ABGTg7 C1 e N1)

Os resultados obtidos em 57 crianças infectadas mostraram que em 11, o único critério de infecção foi a detecção do parasita, sendo a placenta infectada mais frequentemente quando a infecção é adquirida tardiamente na gestação. O PCR para o gene B1 mostrou-se sensível, específico e permitiu obter resultados mais rápidos do que a inoculação em camundongo (BESSIÈRES et al, 2001).

O PCR é de grande sensibilidade e sua importância é indiscutível em situações clínicas definidas pela pesquisa aplicada, como na toxoplasmose congênita. Pode ser realizado no líquido amniótico, no sangue de cordocentese, de recém-nascidos, de pacientes sidéticos, em material cerebral, em líquido cefalorraquidiano e em lavado broncoalveolar (CAMARGO, 2001; HOHLFELD et al, 1994; ROMAN et al, 2001). A distinção entre taquizoítas (infecção ativa) e formas císticas (infecção crônica ou latente), pode ser obtida se os *primers* utilizados considerarem as diferenças entre os genomas das duas formas, o que exige execução e interpretação criteriosas do PCR. A análise no pré-natal de 1.867 casos novos permitiu

afirmar que o PCR (amplificação do gene B1) é rápido, sensível e específico, em relação aos testes previamente utilizados para esta finalidade (FORESTIER et al, 1998).

Dupouy-Camet et al. (1993) consideram o PCR em sangue venoso um método não-invasivo e sensível para o diagnóstico da toxoplasmose disseminada e cerebral em pacientes com SIDA, um recurso potencial para monitorar a resposta ao tratamento.

Em nosso meio, Spalding et al. (2002) otimizaram o PCR realizando a amplificação gênica com *primers* do genes B1 e TGR (ABGTg7 C1 e N1), para diagnóstico em sangue venoso e em placentas de gestantes no pré-natal. Na figura 12 pode-se observar a sensibilidade do PCR simples com primers B1, avaliada com quantidades crescentes de parasitas.

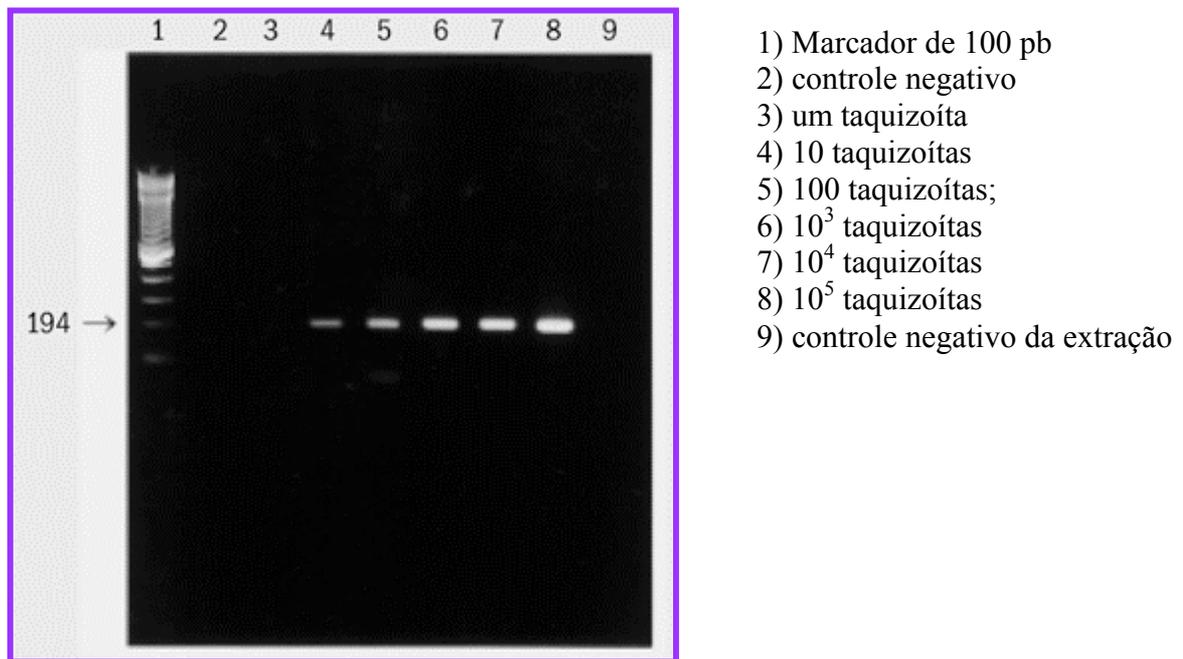


Figura 12 - PCR, eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etidium. (SPALDING, 2002)

A técnica ainda não está definitivamente padronizada em sua complexidade para diferentes usos diagnósticos. Pelloux, Guy, Angelici et al (1998) analisaram o desempenho do PCR no diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita. De quinze laboratórios com diferentes protocolos (genes alvos: p30, rDNA, 18SrDNA), nove foram capazes de detectar um único parasita, o que ressalta a necessidade de controle de qualidade externo com amostras de referência.

## **6 MEDIDAS DE PREVENÇÃO**

Em cada uma das fases do processo saúde-enfermidade, é possível um tipo de prevenção. As medidas de prevenção primária incluem a promoção da saúde (educação, saneamento básico, nutrição adequada) e a proteção específica contra doenças. Quando a doença já se manifestou, tem-se a possibilidade de limitar o dano mediante intervenção, impedindo que o paciente piore. Detecção precoce e limitação do dano fazem parte da prevenção secundária. Assim, na prevenção da toxoplasmose congênita, analisar-se-á a eficácia das medidas de prevenção primária e secundária.

## **6.1 PREVENÇÃO PRIMÁRIA**

Como não existe vacina para toxoplasmose, apesar das pesquisas em modelos animais (ELSAID et al, 2001; YAP & SHER, 1999; REIS, LÖSCH & LAGO, 1999), a educação sanitária é a maneira mais efetiva, simples e econômica de prevenir a infecção congênita, através da educação da gestante sobre comportamentos preventivos. Experiências em várias partes do mundo mostraram que o risco de toxoplasmose congênita pode ser, pelo menos, extremamente reduzido se as gestantes seguirem poucas regras no cuidado de animais de estimação (gatos), hábitos alimentares e higiene pessoal. Os programas de prevenção devem ser adaptados a cada região, levando em conta principalmente a prevalência da infecção na população e os hábitos de vida regionais e podem ser extensivos a todas as gestantes, não necessariamente apenas às soronegativas, com maior risco de fazer a infecção primária durante a gestação (HARTUP, JOHNSON & HOLLIMAN, 1997; LOPEZ et al, 2000), já que reinfecções podem ocorrer.

Para Lynfield, Hsu e Guerina (1999), a prevenção de infecção materna como forma de diminuir a incidência de toxoplasmose congênita não pode ser esquecida. A diminuição da

soroprevalência em algumas áreas geográficas nas últimas décadas pode ser devido à melhor compreensão dos riscos de adquirir a infecção.

## **6.2 PREVENÇÃO SECUNDÁRIA**

A prevenção secundária da toxoplasmose congênita pode ser obtida através da triagem pré-natal, da triagem neonatal ou de ambas. A triagem pré-natal foi introduzida em alguns países como na Áustria, na França, na Noruega e na Bélgica e em outras áreas, a triagem neonatal foi a estratégia escolhida como na Dinamarca, em Massachusetts e na Polónia (RICCI et al, 2003).

### **6.2.1 Prevenção na gestante**

Resultados promissores com o tratamento da gestante agudamente infectada quanto à diminuição da frequência e da severidade da infecção congênita surgiram na literatura a partir da década de 1980 (COUVREUR et al, 1984; DESMONTS & COUVREUR, 1984; FOULON et al, 1999; MCAULEY et al, 1994; MUÑOZ et al, 1995; REMINGTON et al, 2001). A redução de casos severos de 14% em gestantes não tratadas para 4% em gestantes tratadas com espiramicina justificava medidas preventivas baseadas na triagem sorológica da gestante para identificar soroconversão e iniciar o tratamento assim que a infecção materna fosse detectada (COUVREUR et al, 1984).

Para Lappalainen, Sintonen, Koskiniemi et al. (1995) a prevenção secundária pode ter um resultado favorável se houver implementação de um programa de triagem na gestante, esforços para o diagnóstico intra-útero e tratamento materno e da criança. Quando a infecção materna é diagnosticada por soroconversão ou por IgM positiva associada à baixa avidéz, o PCR no líquido amniótico auxilia a verificar se há infecção fetal. Alta avidéz materna no

primeiro trimestre é um forte indício de ausência de infecção primária materna e de risco para o feto.

O custo-benefício da triagem na gestante deve considerar, no entanto, o custo da sorologia levando em conta a frequência com que os testes sorológicos são solicitados, o custo das especialidades de referência e do diagnóstico pré-natal positivo. Também se precisa considerar o custo para a sociedade de uma criança doente por falta de diagnóstico precoce ou por tratamento tardio. O impacto psicológico sobre a mãe com uma criança doente que poderia ter sido tratada ou sobre uma gestante com resultados anormais que necessita repetições seriadas da sorologia e testes para diagnóstico de infecção fetal no pré-natal é difícil de avaliar (WONG & REMINGTON, 1994).

A definição de qualquer programa de triagem requer um estudo da doença, testes dos procedimentos, tratamento e suporte administrativo, de forma que uma relação dano-benefício possa ser estabelecida (WILSON & JUNGNER, 1968).

A Áustria e a França iniciaram um programa de triagem nacional em 1978 e 1985, respectivamente, para detectar e tratar imediatamente todas as infecções agudas que ocorrem durante a gestação. As gestantes que desconhecem seu perfil imunológico são testadas durante o primeiro trimestre da gestação. As soronegativas recebem educação preventiva e são retestadas mensalmente (França) e trimestralmente (Áustria) para identificar soroconversão (BESSIÈRES, BERREBI, ROLLAND et al, 2001; WALLON, FRANCK, ROMAND et al.). As gestantes com evidência sorológica de infecção aguda recebem espiramicina, são avaliadas por ultrassonografia e sofrem uma amniocentese. Se infecção fetal é diagnosticada, recebem sulfonamida e pirimetamina, apesar dos riscos potenciais de teratogênese e de toxicidade para

a medula óssea (REMINGTON et al, 2001). Além disso, os pais têm a opção de interromper a gestação quando há evidência de lesões macroscópicas fetais (BERREBI et al 1994; WALLON et al 1997).

O diagnóstico pré-natal pode, no entanto, ser falso-negativo. A obtenção de sangue fetal tem riscos e o diagnóstico definitivo com os testes parasitológicos convencionais é demorado (DAFFOS et al, 1988), razão de terem sido substituídos pelo PCR que é rápido, sensível e específico (FORESTIER et al, 1998), mas necessita de controle de qualidade externo com amostras de referência (PELLOUX, GUY, ANGELICI et al. 1998).

Um estudo retrospectivo multicêntrico de 294 gestantes com soroconversão durante a gestação e seus recém-nascidos detectou 93 crianças (32%) infectadas. Infecção fetal foi definida pela presença de IgM e IgA específicas no período neonatal e detecção do parasita na placenta ou no soro de cordão por inoculação em camundongo. As sensibilidades da IgA e da IgM foram de 64 e 41% no sangue de cordão e de 66 e 42% no sangue do recém-nascido, respectivamente. A sensibilidade da inoculação em camundongo foi de 45% na placenta e 16% no sangue de cordão. A sensibilidade da sorologia correlacionou-se significativamente com a idade gestacional da infecção materna, mas não foi significativamente influenciada pelo tratamento pré-natal. A especificidade dos testes sorológicos foi melhor com o sangue do recém-nascido do que com o sangue de cordão (NAESSENS et al, 1999).

A triagem sistemática da gestante permitiu conhecer o risco de transmissão materno-fetal e da gravidade das seqüelas, ambos relacionados com a idade gestacional em que a soroconversão materna ocorre. Em 165 gestantes que apresentaram soroconversão durante a

gestação, a idade gestacional foi de 16,5 semanas nas 108 crianças não-infectadas e de 24 semanas nas 57 crianças infectadas (BESSIÈRE et al, 2001).

O risco de transmissão para aconselhamento clínico foi de 29% em outra série de gestantes com soroconversão: 2% na oitava, 6% na 13<sup>a</sup>, 72% na 36<sup>a</sup> e 81% quando a infecção primária ocorreu após a 36<sup>a</sup> semana de gestação. As crianças podem ser severamente comprometidas ou assintomáticas ao nascer. O risco estimado de desenvolvimento de sinais clínicos como hidrocefalia, retinocoroidite e calcificação intracraniana isolada, foi de 61% (95% CI 34-85%) na 13<sup>a</sup> semana, 25% (18 a 33%) na 26<sup>a</sup> semana e 9% (4-17%) na 36<sup>a</sup> semana. O prognóstico é mais favorável quanto mais tardiamente a infecção primária ocorre, mesmo assim, é de 6% a partir da 36<sup>a</sup> semana. Após detecção de infecção materna, o risco máximo de sinais clínicos precoces é de cerca de 10% entre a 24<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas (DUNN et al, 1999).

Uma revisão sistemática sobre evidência de eficácia no tratamento da gestante não esclareceu se o tratamento pré-natal reduz a transmissão congênita do parasita. A revisão partiu de 2.591 artigos, 305 foram seleccionados na primeira revisão, apenas nove tinham grupo-controle, mas nenhum preencheu os critérios de inclusão (WALLON et al 1999).

A qualidade dos trabalhos foi medida através de uma escala de zero a seis, baseada em seis itens, com igual peso: (1) alocação randomizada de grupo: 1, (2) recrutamento dos grupos na mesma localidade: 1, (3) recrutamento dos grupos no mesmo período de tempo: 1, (4) análise baseada na intenção de tratar: 1, (5) inclusão das perdas de seguimento: 1, (6) perdas inferiores a 10% do total: 1. Dois de cinco estudos em que houve um efeito benéfico e três de

quatro em que não houve efeito benéfico do tratamento pontuaram mais do que quatro quanto à qualidade dos trabalhos.

A falta de ensaios clínicos randomizados não permitiu estabelecer se o tratamento da gestante reduz a transmissão do parasita ou os sinais clínicos no recém-nascido, assim, países que ainda não iniciaram a triagem na gestante não devem iniciá-la antes de ter bem claro a relação custo/ benefício em profilaxia. Os efeitos potenciais indiretos da triagem não foram analisados, como assegurar às gestantes imunes que os riscos de transmissão são desprezíveis, intensificar a educação preventiva nas suscetíveis, possibilitar aos pais a interrupção da gestação quando o feto está comprovadamente infectado (PCR positivo em fluido amniótico e ou alterações na ultrassonografia) e possibilitar a continuação do tratamento no pós-natal.

Gilbert et al (2001) estudaram o efeito do tempo e do tipo de tratamento prenatal na transmissão materno-fetal do *T. gondii* em 554 gestantes infectadas, sendo as análises ajustadas para a idade gestacional em que a soroconversão ocorre. O tratamento pré-natal não diminuiu o risco de transmissão, possivelmente porque a transmissão do parasita ocorre antes do início do tratamento. Para Gras et al (2001) não houve qualquer efeito benéfico do tratamento prenatal precoce ou mais agressivo quanto ao aparecimento de lesões intracranianas e oculares aos três anos de idade.

Nos Estados Unidos, considera-se que a incidência de infecção materna é baixa, assim como a chance de infecção congênita (LOPEZ et al, 2000). Embora a incidência de toxoplasmose nos EU seja baixa, mais de 6.000 casos de toxoplasmose congênita ocorrem anualmente. Um estudo realizado em 1999 entre membros do American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) e de um grupo representativo do Collaborative

Ambulatory Research Network (CARN) revelou que a maioria dos profissionais encontrará toxoplasmose durante suas carreiras, mas se sentem inseguros quanto à interpretação dos resultados laboratoriais e não recomendariam a triagem universal na gestante (JONES et al, 2001).

Na Inglaterra, país em que a prevalência da infecção é baixa, a triagem na gestante possivelmente preveniria infecção congênita em 10 recém-nascidos/ 10.000 gestações (ALLAIN et al, 1998), mas a maioria dos estudiosos no assunto acredita que ainda não existem evidências que justifiquem a implantação da triagem de rotina na gestante.

Para Lappalainen et al (1995a), a toxoplasmose congênita é um risco para o feto tanto em áreas de alta quanto de baixa prevalência. A análise do custo-benefício baseada em dados de um estudo prospectivo em que a soropositividade foi de 20,3% em gestantes, a incidência de toxoplasmose congênita de 2,4%/ 1.000 gestações soronegativas e o risco de transmissão materno-fetal de 40%, concluiu que a triagem na gestante é economicamente viável, mesmo em países com baixa prevalência. O resultado é favorável se houver implementação de um programa de triagem na gestante, esforços para o diagnóstico intra-útero e tratamento materno e da criança. Quando a infecção materna é diagnosticada por soroconversão ou por IgM positiva associada à baixa avididade, o PCR no líquido amniótico auxilia a verificar se há infecção fetal. Alta avididade materna no primeiro trimestre é um forte indicador de ausência de infecção primária materna e de risco para o feto.

Para Lynfield et al (1999) a triagem pré-natal é cara, especialmente para regiões de baixa prevalência e os testes pré-natais para confirmar infecção fetal são invasivos, no entanto, diversos estudos recentes relatam baixa incidência de doença severa na criança

quando a mãe é diagnosticada e tratada no pré-natal. Para Greco et al (2003), a triagem pré-natal tem como pontos fracos o número elevado de procedimentos invasivos e a prevenção questionável da transmissão materno-fetal no segundo e terceiro trimestres.

### **6.2.2 Triagem materna pós-parto**

Quando a toxoplasmose congênita resulta de infecção primária materna adquirida tardiamente na gestação, os recém-nascidos são frequentemente assintomáticos ao nascer e só podem ser reconhecidos se houver um programa apropriado de triagem sorológica materna pós-parto. As complicações são essencialmente oftalmológicas sob forma de retinocoroidite uni ou bilateral. Estrabismo e microftalmia estão também relacionados à infecção congênita tardia. Os autores descrevem dois casos: no primeiro, parto cesáreo foi realizado na 36ª semana por sofrimento fetal e o prematuro apresentou infecção sistêmica; no segundo, parto cesáreo foi realizado na 37ª semana por retardo no crescimento intra-uterino e placenta hipoplásica. A criança apresentou estrabismo divergente com três meses e cicatriz na mácula (WIRDEN et al, 1999).

### **6.2.3 Triagem neonatal**

A triagem neonatal é considerada uma alternativa prática e de baixo custo quando a incidência de infecção primária na gestante é baixa (EVENGÄRD et al, 2001; LEBECH et al, 1999). Baseia-se no fato de que a maioria das crianças com infecção congênita é assintomática ao nascer, mas muitas irão desenvolver manifestações clínicas severas na infância ou adolescência, como cegueira ou retardo mental. Aos 20 anos, mais de 85% já teve retinocoroidite.

Um estudo identificou 100 crianças positivas na triagem neonatal em 635.000 analisadas. Infecção congênita foi confirmada em 52, sendo 50 identificadas apenas pela triagem. Exame clínico mais detalhado identificou anormalidades no Sistema Nervoso Central ou na retina em 19 de 48 (40%) crianças avaliadas. Depois de um ano de tratamento apenas uma das 46 crianças havia desenvolvido comprometimento neurológico, uma hemiplegia atribuída à lesão cerebral presente no nascimento. Quatro de 39 crianças (10%) acompanhadas com exames oftalmológicos do primeiro aos seis anos apresentaram novas lesões. Os autores concluem que a triagem neonatal identifica infecções congênitas subclínicas, assim, tratamento precoce pode reduzir a gravidade das seqüelas tardias (GUERINA et al, 1994). Os resultados do tratamento por um ano de crianças com toxoplasmose congênita são melhores também para McAuley et al (1994), do que os obtidos com tratamentos mais curtos.

Brèssieres et al (2001) analisaram 165 gestantes infectadas por um período de 10 anos para avaliar a eficiência do diagnóstico neonatal na infecção congênita. O estudo não incluiu gestantes com soroconversão anterior à oitava semana de gestação, interrupções terapêuticas, morte fetal intra-útero ou crianças sem monitoramento sanguíneo. Em 22 gestantes infectadas após a 29ª semana, o diagnóstico pré-natal não foi realizado. Todas as gestantes receberam espiramicina desde que a soroconversão foi documentada e pirimetamina, sulfadoxina e ácido fólico por cinco semanas após o diagnóstico de infecção fetal. A pirimetamina foi mantida até o termo para reduzir a gravidade das seqüelas. O isolamento do parasita após tratamento da gestante com feto infectado foi menor.

Infecção fetal definida como persistência de IgG durante o primeiro ano de vida foi encontrada em 57 crianças, ou seja, em 34,5% das gestações de risco determinadas pela soroconversão materna. Quarenta e três por cento (43%) das crianças cujas mães se

infectaram no segundo trimestre e 73% das crianças cujas mães se infectaram no terceiro trimestre, foram também infectadas.

O diagnóstico neonatal foi positivo em 50 das 57 crianças (88%): o isolamento do parasita a partir da placenta ocorreu em 60%, do sangue de cordão em 43% e em 18% dos casos foi o único critério de infecção. A sorologia foi realizada em 42 casos e permitiu o diagnóstico de infecção congênita em 81%, a IgA detectada mais frequentemente (60%) do que a IgM (40%). O diagnóstico pré-natal em 40 crianças infectadas resultou positivo em 30 (75%). A combinação triagem pré-natal e neonatal permitiu o diagnóstico de 39 em 40 crianças (98%). Os autores concluem que a triagem neonatal combinando detecção do parasita e testes sorológicos no sangue do cordão é essencial quando o pré-natal é negativo e permite iniciar o tratamento precoce da criança.

A taxa de transmissão em 139 gestantes com soroconversão detectada por IgG neonatal, portanto, não tratadas, e as conseqüências para as 141 crianças (dois pares de gêmeos), foram analisadas em uma área em que a prevalência da infecção é baixa. O programa de triagem neonatal baseado apenas na detecção de IgM em cartões de PKU (phenylketonuria) identificou 27 crianças, das quais quatro (15%) tinham sinais e sintomas clínicos. Duas crianças desta série não foram detectadas pela IgM neonatal. Crianças IgM neonatal negativas foram seguidas com exames clínicos e sorológicos por um ano (LEBECH et al, 1999).

Considerações sobre o trabalho de Lebech et al (LYNFIELD, HSU & GUERINA, 1999) salientam que os autores detectaram apenas 15% das crianças com toxoplasmose congênita com sinais clínicos, enquanto a triagem neonatal realizada pelo New England

Regional Newborn Screening Program detectou 40%. Seriam estas diferenças relacionadas à metodologia utilizada ou a diferenças regionais? O tempo de acompanhamento foi de apenas 12 meses e a IgM deveria ter sido associado à IgA para aumentar a sensibilidade da sorologia no período neonatal.

Robert-Gangneux et al (1999) ao avaliarem o diagnóstico pré e pós-natal da toxoplasmose congênita em 110 gestantes com soroconversão durante a gestação, encontraram 27 casos de infecção congênita diagnosticadas no período pré e/ ou neonatal (20 nascidos vivos). A sensibilidade do diagnóstico pré-natal foi de 81% e a especificidade de 100%. O exame da placenta foi positivo em 66,7% dos casos e IgM ou IgA foram detectadas em 80% com especificidade de 91,2% e 87,7% respectivamente. O Western Blot detectou neossíntese de IgG e/ou IgM em 88,2% das crianças infectadas nos primeiros dois meses, com especificidade de 100%. O diagnóstico neonatal foi negativo em dois dos 20 recém-nascidos com toxoplasmose congênita. O pré-natal nestas crianças era negativo e ambos foram assintomáticos ao nascer, o que sugere uma carga muito baixa de parasitas e a importância do acompanhamento cuidadoso dos recém-nascidos durante o primeiro ano de vida quando houver risco de infecção fetal. Apesar do uso de métodos sofisticados, alguns casos de toxoplasmose congênita não podem ser detectados precocemente, o que reforça a importância do seguimento cuidadosos dos recém-nascidos em risco.

Para Naessens, Jenum, Pollak et al. (1999) a triagem neonatal com IgA ou IgM não detecta a maioria das crianças infectadas quando a infecção materna foi anterior à 20ª semana de gestação. Na série de Sorenen, Spenter, Jaliashvili et al (2002), nenhum recém-nascido com toxoplasmose congênita foi detectado somente pela IgA.

Em um estudo retrospectivo, o desempenho do WB quanto aos padrões de IgG e IgM foi avaliado em 60 pares mãe/criança, em relação às pesquisas de IgM e IgA neonatal por ensaio de captura e ao título de IgG. O acompanhamento clínico e sorológico das crianças foi realizado durante o primeiro ano de vida até que o diagnóstico de toxoplasmose congênita fosse confirmado ou excluído. Dezesete crianças foram infectadas, a IgM detectou 76,5% e a IgA 70,6% no sangue do cordão, com especificidades de 77,5% para ambas. A neossíntese de anticorpos identificada pelo WB foi de 50% para IgG e de 78,6% para IgM, com especificidade de 100%. As combinações (a) IgA-IgM por captura, (b) WB-IgG e IgM e (c) “a” e “b” permitiram a detecção de 94%, 94% e 100% dos casos nos primeiros três meses. O WB parece ser uma ferramenta complementar para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita (ROBERT-GANGNEUX, COMMERE, TOURTE-SCHAEFER et al).

Ricci et al. (2003) compararam as duas abordagens, triagem na gestante e neonatal em 8.061 gestantes e 9.730 recém-nascidos para avaliar a efetividade das medidas em uma área com alta prevalência (54,34%). De 5.288 gestantes suscetíveis, 188 gestantes foram infectadas, sendo a taxa de transmissão de 11,3 % e maior no último trimestre, com um risco relativo de 10,6%. De 21 recém-nascidos infectados, quatro apresentavam doença clínica. Na triagem neonatal foram realizadas a pesquisa de IgG, IgM, IgA, AD e IFA. Quatro recém-nascidos foram positivos (0,4/1000), um com doença clínica. A triagem neonatal pareceu menos efetiva do que a triagem da gestante. Os dados observacionais não sustentaram a efetividade do tratamento da gestante para prevenir doença clínica.

Em Porto Alegre, a associação das triagens sorológicas pré e neonatal estimou uma prevalência de 6/10,000 [95% CI 1.3/10,000, 10.7/10,000] recém-nascidos vivos, sendo a triagem pré-natal menos efetiva do que a neonatal, especialmente em infecções tardias na

gestação (LAGO et al, 2003). Para Neto et al. (2000), a triagem neonatal deve ser considerada uma alternativa, se a triagem na gestante não for realizada.

#### **6.2.4 Índices de infecção fetal**

Os melhores trabalhos para definir estratégias de prevenção são os que estudam os índices de infecção fetal, definindo infecção fetal pela persistência de IgG específica na criança após um ano de vida. Evita-se, assim, que as infecções adquiridas tardiamente na gestação sejam perdidas, como em trabalhos que utilizam apenas a detecção de IgM neonatal ou o acompanhamento clínico da criança. Evita-se, também, a perda de infecções fetais por reativação de infecção crônica materna ou reinfecção materna com cepa diferente quanto à virulência.

#### **6.2.5 Prevenção no Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas**

Entre outubro de 1.998 e março de 2.000 foram analisadas 3.359 sorologias para toxoplasmose no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas (PETRY et al, 2000). Testes fluorométricos foram utilizados para IgG (MEIA) e IgM (ELFA), figuras 13 e 14. Houve 91 (2,71%) gestantes IgM inconclusivas ou positivas, divididas em dois grupos: (1º) IgG negativa/ IgM positiva ou inconclusiva: 5 amostras e (2º) IgG positiva/ IgM positiva ou inconclusiva: 86 amostras.

No segundo grupo, encontrou-se: (a) uma gestante com índice de IgM superior a 3,5, (b) 59 gestantes com índices entre 0,65 e 3,0 e (c) 26 gestantes com índices inconclusivos. Seguindo a árvore diagnóstica (Figura 15), foi solicitada uma segunda coleta de sangue em duas as três semanas às 91 gestantes.

Apenas 30 gestantes (35,3%) retornaram para a coleta da segunda amostra e em todas, os níveis de anticorpos mantiveram-se inalterados. Os resultados da segunda amostra não tranquilizaram obstetras, pois 14 gestantes retornaram para repetir a sorologia três ou mais vezes num intervalo de 11 meses. Estas dificuldades levaram à introdução da avidéz de IgG às gestantes no primeiro trimestre da gestação (PETRY et al, 2000).

Os níveis de IgG e os índices de IgM e de avidéz de IgG foram comparados em amostras seqüenciais para determinar a presença de infecção aguda e o risco de infecção fetal. A repetição da sorologia foi desnecessária em 89 das 90 gestantes analisadas (REIS et al, 2003a). A coleta da segunda amostra parece justificável apenas quando a IgM é reagente e a IgG não-reagente ou em níveis inferiores a 20 UI/ml para definir se a IgM é falso-positiva ou se a infecção é muito recente. (REIS et al, 2003b). Os níveis de IgG pelas duas técnicas, ELFA e MEIA, não foram comparáveis (REIS et al, 2003c).

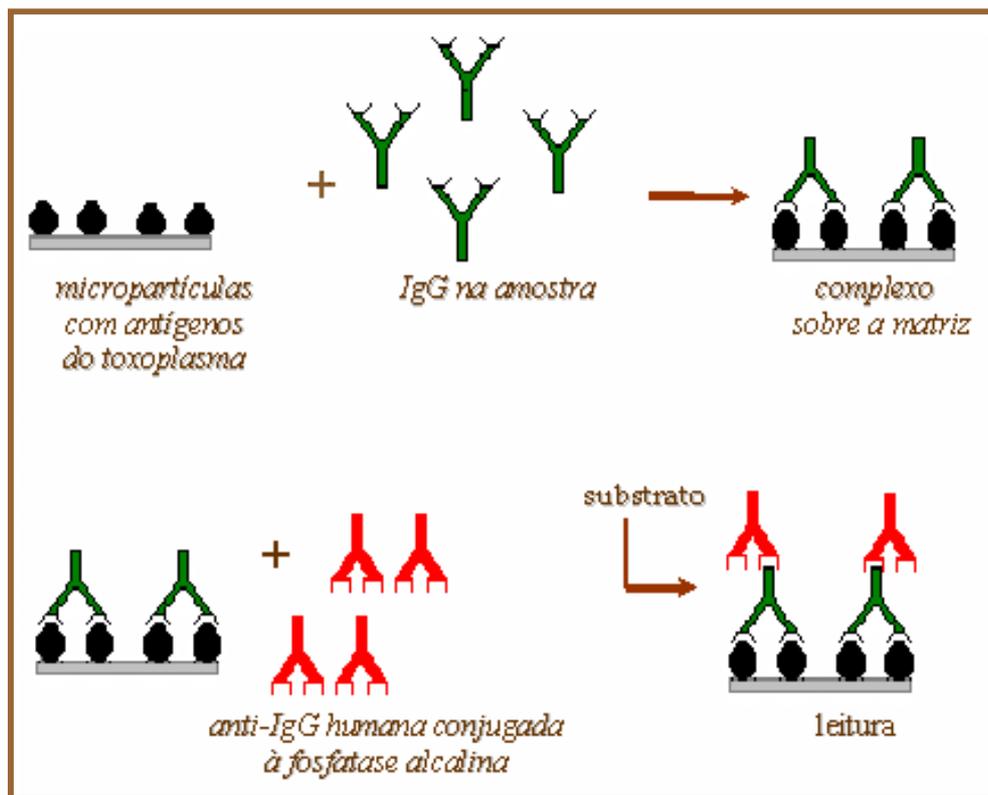


Figura 13 - Pesquisa de IgG anti-*T. gondii* utilizando o MEIA (REIS, 1998)

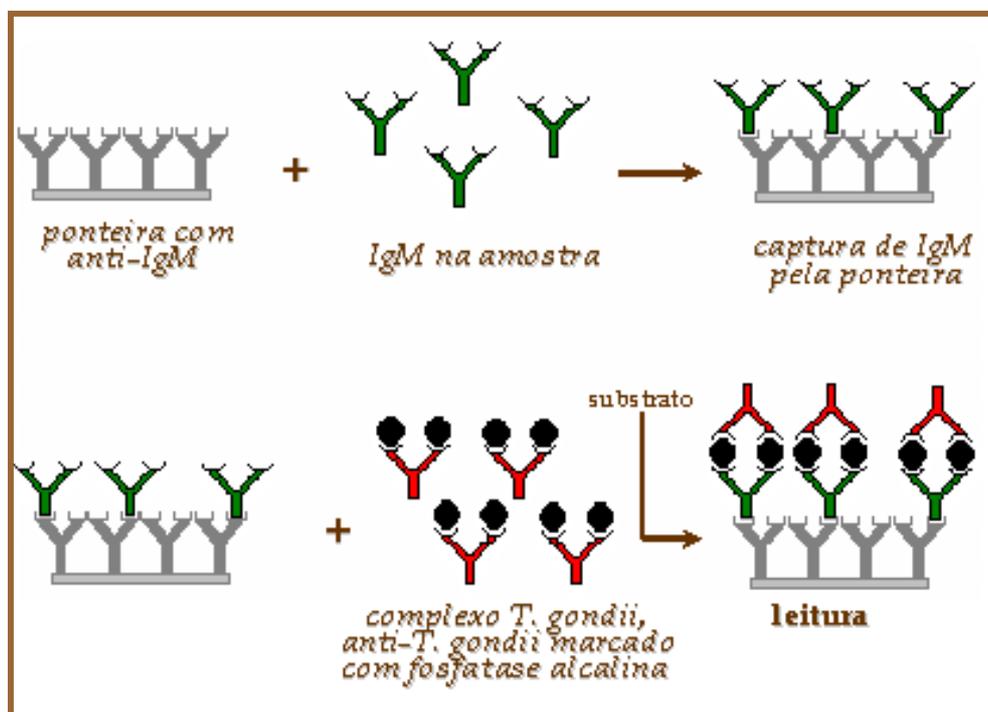


Figura 14 - Pesquisa de IgM anti-*T. gondii* utilizando o ELFA (REIS, 1998)

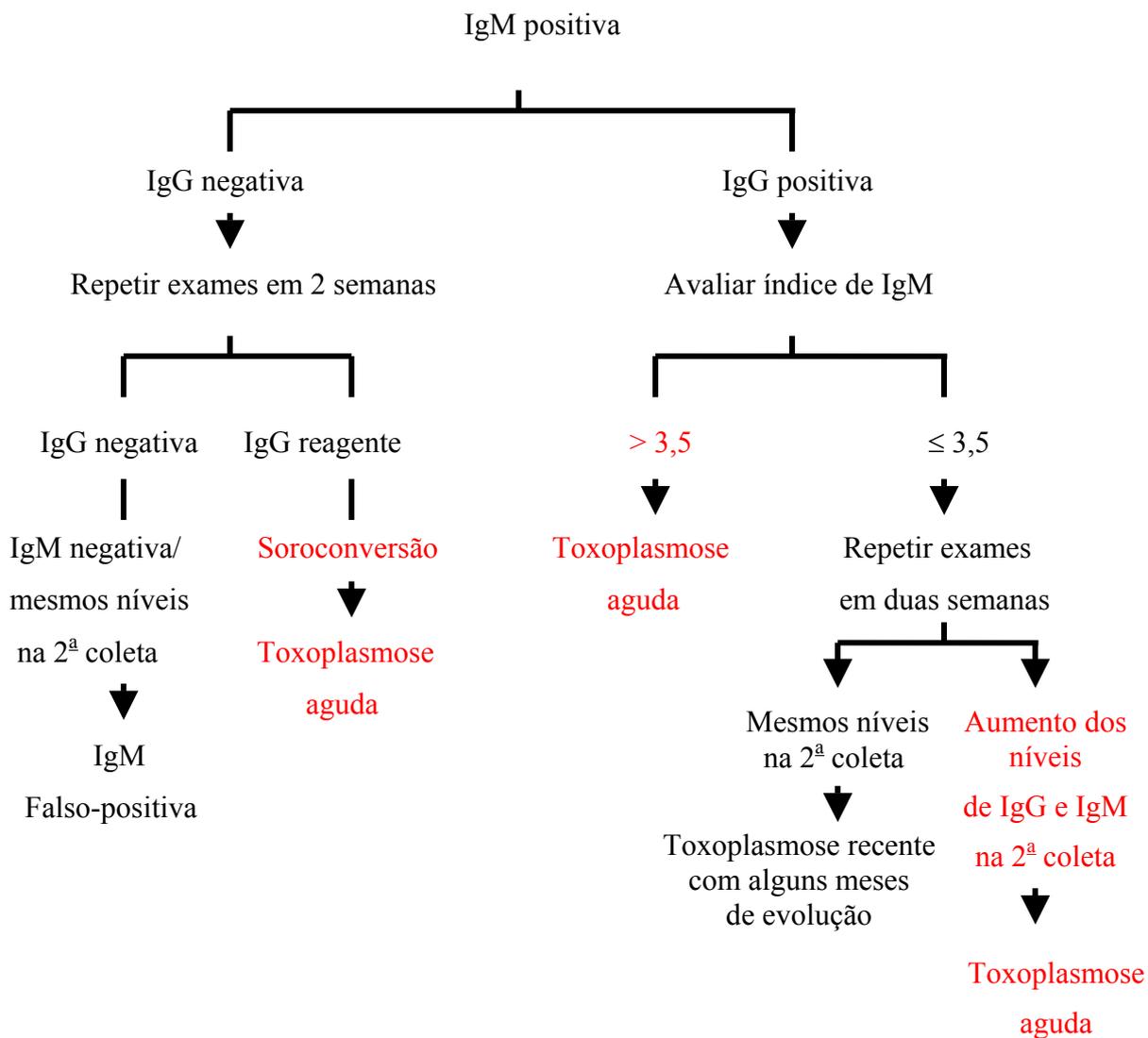


Figura 15 - Árvore diagnóstica para gestante ELFA-IgM positiva. (REIS, 1998)

Entre 2000 e 2002, foram analisadas 2.768 sorologias, 109 (3,9%) eram IgM inconclusiva ou positiva e em 36 foi realizada a pesquisa da avidez porque a gestante estava no início da gestação ou por solicitação médica. Testes fluorométricos foram utilizados para IgG (MEIA) e IgM e avidez (ELFA). O nível de IgG da amostra pelo ELFA precisa ser conhecido (tira de referência) para definir a diluição ideal de trabalho antes de utilizar a uréia, o agente de dissociação, que define a avidez da amostra (tira teste). As técnicas foram processadas e os resultados foram expressos como recomendam os fabricantes. Alta avidez excluiu infecção pós-concepção em dezessete gestantes no primeiro trimestre (Duarte,

Tessaro e Reis, 2002). A árvore proposta para a utilização da avidéz no início da gestação pode ser observada na figura 16 e o esquema do ELFA para avidéz nas figuras 17 e 18.

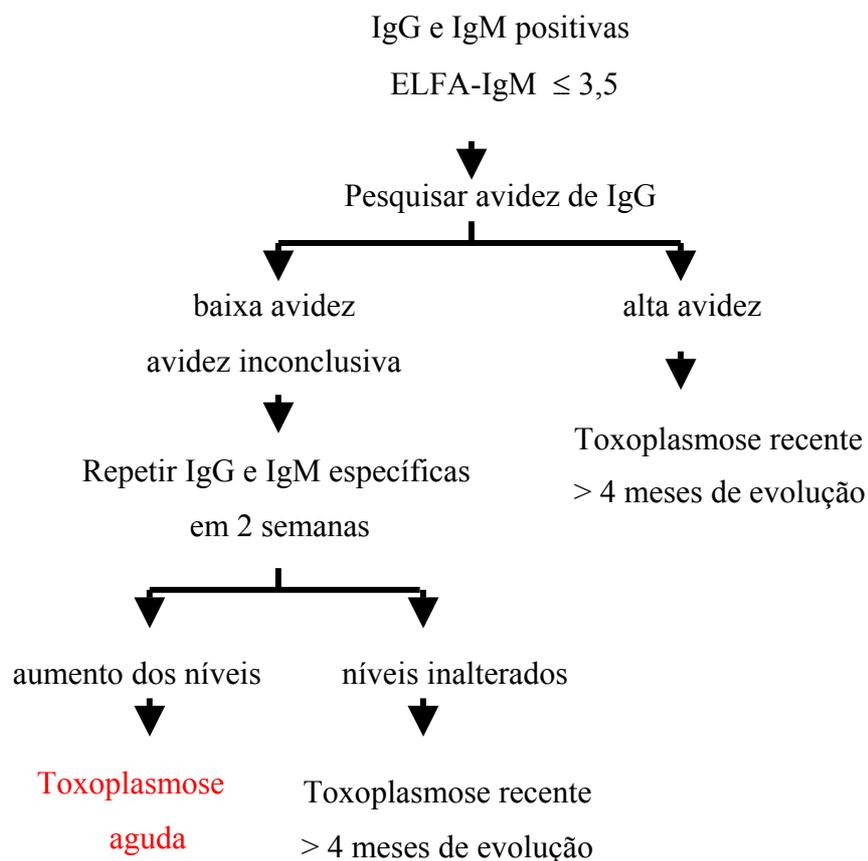


Figura 16 - Árvore diagnóstica proposta para a avidéz de IgG no primeiro trimestre da gestação (REIS, 2001)

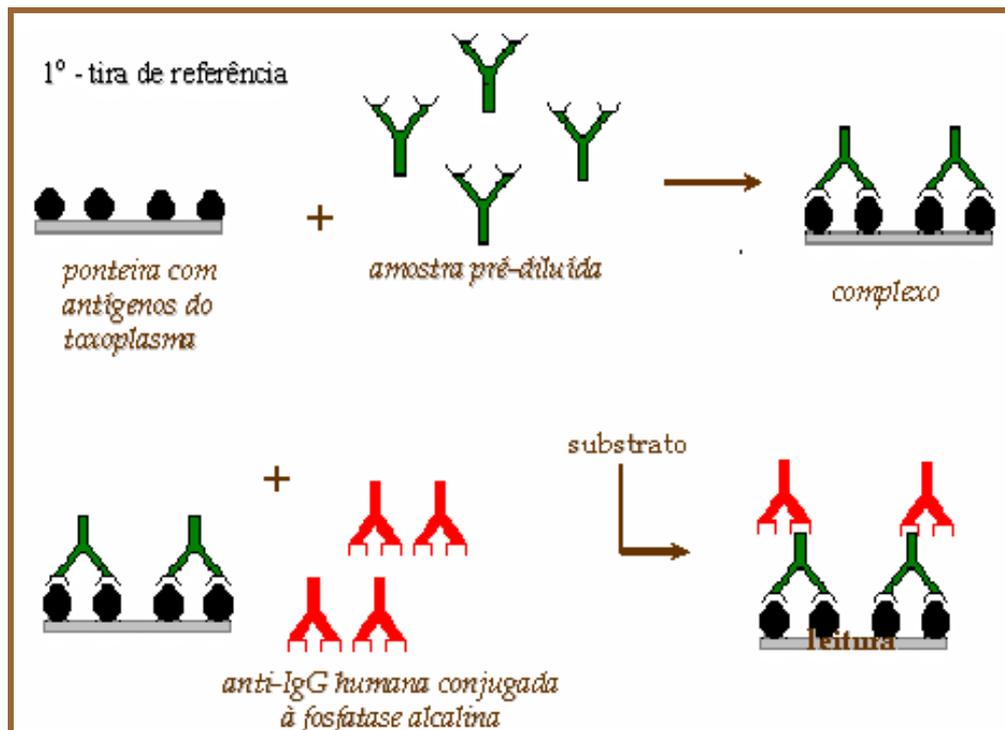


Figura 17 - Tira de referência: Determinação dos níveis de IgG pelo ELFA.

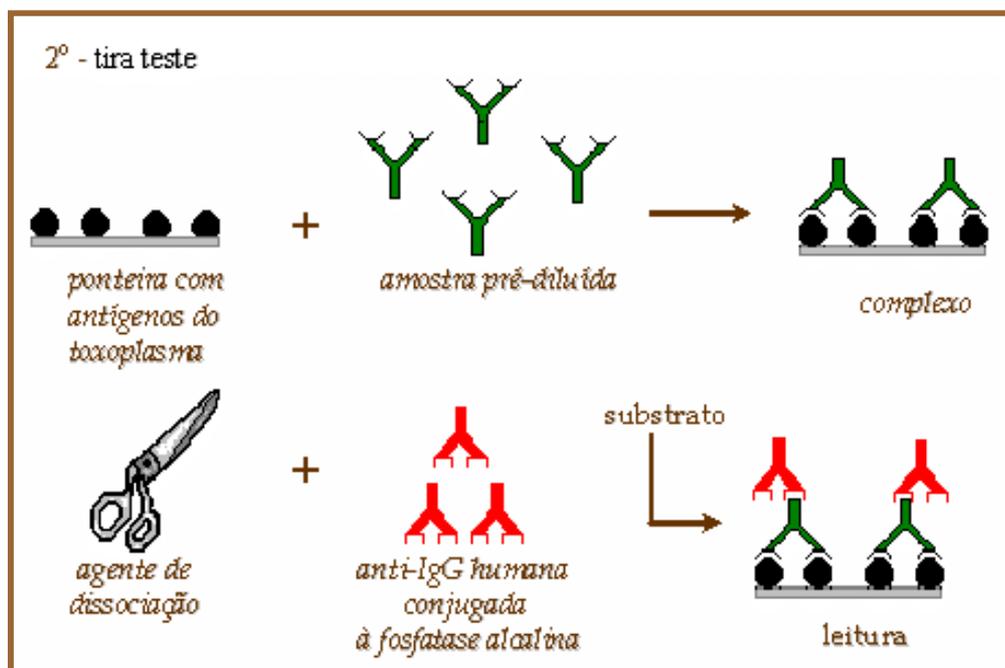


Figura 18 - Tira teste: Permite calcular a avidéz de IgG da amostra.

A infecção provável pelo *Toxoplasma* em uma parturiente com feto morto, cuja sorologia foi compatível com infecção aguda: IgG 2.000 UI/ml, índice de IgM de 1,88 e de avidéz de 0,075 (baixa), levou à realização da avidéz em todas as amostras IgM positivas, independente da idade gestacional, especialmente porque amostras isoladas ou tardias, como a deste caso, são freqüentes. A motivação foi a possibilidade de selecionar um grupo de gestantes IgM positivas com baixa avidéz quanto ao risco de infecção aguda e transmissão, permitindo o diagnóstico precoce do recém-nascido através da pesquisa de IgM neonatal, o tratamento do recém-nascido positivo e o acompanhamento sorológico do recém-nascido negativo durante o primeiro ano de vida.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Avaliar o desempenho dos índices de IgM e de avidéz de IgG anti-*T. Gondii* como marcadores de infecção adquirida durante a gestação em amostra única, independentemente da idade gestacional, tendo a IgM neonatal como evidência de parasitemia.

### **Especificos**

Definir se a avidéz de IgG pode ser um marcador de risco de infecção congênita pelo *T. gondii* nos segundo e terceiro trimestres da gestação.

Definir se os índices de avidéz de IgG anti- *T. Gondii* correlacionam-se com os índices de IgM em gestantes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A avidéz de IgG anti-*T. gondii* foi prospectivamente determinada em todas as amostras IgG e IgM positivas obtidas de gestantes em sua primeira visita ao Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, entre 2000 e 2004, independente da idade gestacional. O critério estabelecido para confirmar transmissão materno-fetal foi a presença de IgM neonatal. Sinais clínicos de infecção congênita em um natimorto foram também considerados e uma amostra sérica da parturiente foi avaliada quanto à pesquisa de anticorpos específicos.. Nas gestantes que tiveram o parto realizado no hospital foi obtida uma amostra sérica do recém-nascido para processar IgG e IgM.

A IgG anti-*T. gondii* foi medida pela técnica comercial MEIA, AxSYM<sup>®</sup> System Toxo IgG (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). Os resultados foram expressos em Unidades Internacionais por mililitro (UI/ml), negativo: < 2,0, positivo: > 3,0, inconclusivo: entre 2,0 e 3,0.

A IgM anti-*T. gondii* foi medida pela técnica comercial ELFA, VIDAS Toxo IgM (bioMérieux sa, Lyon, France). Os resultados foram expressos em índices, negativo: < 0,55, positivo: > 0,65, inconclusivo: entre 0,55 e 0,65.

A avidéz de IgG foi também medida pela técnica comercial ELFA Os resultados

foram expressos em índices: baixo:  $< 0,2$ , alto:  $> 0,3$ , inconclusivo: entre  $0,2$  e  $0,3$ . As técnicas foram processadas como recomendam os fabricantes. As IgG e IgM específicas dos recém-nascidos foram processadas com as mesmas técnicas.

O Teste Exato de Fisher foi usado para analisar (a) a associação entre IgM categorizada e transmissão, (b) IgM categorizada e avidéz categorizada, (c) avidéz categorizada e transmissão. O Teste *t* Student foi usado para analisar a associação entre índice de avidéz e transmissão. A correlação de Pearson foi usada para analisar a correlação dos índices de IgM e de avidéz.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, número 20/04, em agosto de 2004 e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre em março de 2006.

## RESULTADOS

A avidéz de IgG foi realizada em 168 amostras IgG e IgM positivas das 6 720 gestantes (2.5%) que tiveram a sorologia realizada neste período e foi alta em 128 (76%) e baixa ou inconclusiva em 40 (24%). A idade gestacional foi informada em 105 gestantes (62.5%), das quais 33 (31,4%) estavam no primeiro, 36 (34,3%) no segundo e 33 (31,4%) estavam no terceiro trimestre da gestação. Cinquenta e uma gestantes (30%) tiveram o parto realizado no hospital, tornando possível obter a IgM neonatal. A sorologia materna de um natimorto com sinais clínicos de infecção congênita foi realizada no período de coleta de dados. Os partos realizados no hospital correspondem a 25% das gestantes com alta avidéz e 47% das gestantes com baixa avidéz.

Entre as 40 gestantes com avidéz baixa ou inconclusiva, 19 tiveram o parto realizado na instituição (Tabela 4). Os níveis de IgG variaram de 106 a 3.356 UI/ml e os índices de IgM de 0,65 e 11,9. Seis mães tiveram índices de IgM superiores a 3,5 e avidéz muito baixa (M1 a M6), 11 tiveram índices baixos de IgM (entre 1,0 e 3,0) e duas somente traços de IgM (entre 0,65 e 0,9). Duas mães estavam no primeiro, seis no segundo e 11 no terceiro trimestre da gestação.

Cinco recém-nascidos IgM positivos (M1, M2, M5, M11 and M13) e o natimorto (M12) resultaram destas mães. Mesmo que o critério de transmissão tenha sido a presença de

IgM neonatal, o natimorto foi incluído como infectado por ter sinais de toxoplasmose congênita ao exame físico. Em três recém-nascidos infectados (M1, M2 e M5), os índices maternos de IgM foram extremamente elevados e em dois recém-nascidos (M11 and M13) e no natimorto (M12), os índices de IgM foram baixos. As sorologias maternas de M2 e M5 foram muito semelhantes: baixos níveis de IgG e altos índices de IgM.

Entre as 128 gestantes com avidez alta, 32 tiveram o parto realizado na instituição (Tabela 5). Os níveis de IgG variaram de 58 a 8.832 UI/ml e os índices de IgM variaram de 0,65 a 2,4. Dezoito mães tiveram índices baixos de IgM (entre 1,0 e 3,0) e 14 mães somente traços de IgM (entre 0,65 e 0,9). Onze mães estavam no primeiro, sete no segundo e 14 no terceiro trimestre da gestação. A IgM neonatal foi negativa em todos os recém-nascidos.

Os dados das 51 parturientes foram utilizados nas análises estatísticas. De acordo com o teste Exato de Fisher existe associação significativa entre IgM materna categorizada (índice maior do que 3,0) e transmissão ( $p < 0,028$ ), IgM neonatal sendo o marcador sorológico de transmissão. IgM alta resulta em um número maior de crianças infectadas do que IgM baixa ou inconclusiva. Existe também uma associação significativa entre IgM categorizada e avidez categorizada ( $p < 0,001$ ), IgM alta sendo associada com avidez baixa e vice-versa. Existe uma associação significativa também entre avidez categorizada e transmissão ( $p < 0,001$ ), avidez baixa associada com transmissão e avidez alta associada com ausência de transmissão usando o índice de corte do fabricante de 0,2. Reduzindo-se o índice de corte para 0,15 aumenta a associação entre avidez baixa e transmissão. De acordo com o Teste  $t$  Student, deve haver associação entre o índice de avidez e transmissão ( $p < 0,001$ ), quanto menor a avidez, maior a chance de transmissão.

De acordo com a correlação de Pearson, existe correlação entre os índices de IgM e avidéz, moderada e inversa, portanto a um índice alto de avidéz corresponde um índice baixo de IgM e vice-versa ( $r = - 0,548$ ,  $p < 0,001$ ). A relação entre os índices de IgM e de avidéz quando a avidéz é baixa pode ser observada na Figura 17 ( $r = - 0,472$ ;  $p = 0,041$ ) e quando é alta, na Figura 18 ( $r = - 0,275$ ;  $p = 0,128$ ).

Tabela 4 – Sorologias das mães com avidéz baixa ou inconclusiva em relação à idade gestacional e à infecção fetal

Mãe	Idade gestacional		IgG IU/ml	IgM índices	Avidéz índices	IgM neonatal índices
	Trimestre					
M1	3º		3356 >300	11.9	0.05	positiva (7.9)
M2	3º		112 173	6.7	0.04	positiva (6.5)
M3	1º		2656 > 300	6.3	0.16	negativa
M4	1º		1060 > 300	4.6	0.04	negativa
M5	3º		155 >300	4.5	0.04	positiva (9.3)
M6	3º		748 >300	4.1	0.08	negativa
M7	3º		560 > 300	3.0	0.08	negativa
M8	2º		176 100	2.6	0.09	negativa
M9	3º		352 > 300	2.5	0.15	negativa
M10	3º		360 > 300	2.5	0.22	negativa
M11	2º		244 > 300	2.4	0.13	positiva (1.4)
M12	3º		2000 > 300	1.9	0.07	natimorto
M13	3º		212 165	1.8	0.02	positiva (2.9)
M14	2º		148 79	1.8	0.29	negativa
M15	2º		280 277	1.7	0.08	negativa
M16	2º		820 > 300	1.0	0.17	negativa
M17	2º		460 > 300	1.0	0.19	negativa
M18	3º		1416 >300	0.7	0.18	negativa
M19	3º		106 28	0.6	0.28	negativa

Tabela 5- Sorologias das mães com avidéz alta, em relação à idade gestacional e à infecção fetal

Identificação gestante	I.G. trimestre	IgG UI/ml		IgM* índices	AVIDEZ índices
		ELFA	MEIA		
M20	3º	1936	>300	2,4	0,37
M21	3º	212	70	2,4	0,40
M22	2º	62	17	2,4	0,42
M23	3º	116	54	2,2	0,66
M24	3º	8832	>300	2,1	0,35
M25	3º	900	>300	2,1	0,34
M26	3º	1752	>300	2,1	0,36
M27	3º	420	85	2,1	0,48
M28	1º	58	21	1,7	0,40
M29	2º	2880	>300	1,5	0,60
M30	3º	188	57	1,4	0,57
M31	1º	-	61	1,4	0,59
M32	3º	528	298	1,4	0,61
M33	3º	592	187	1,3	0,62
M34	2º	1736	>300	1,2	0,34
M35	1º	143	36	1,2	0,50
M36	2º	140	48	1,1	0,43
M37	3º	3216	>300	1,0	0,44
M38	3º	404	126	0,9	0,54
M39	1º	-	31	0,9	0,42
M40	1º	968	>300	0,8	0,63
M41	1º	676	>300	0,8	0,40
M42	3º	59	16	0,8	0,45
M43	3º	244	62	0,8	0,66
M44	3º	288	107	0,7	0,61
M45	3º	712	>300	0,7	0,57
M46	1º	260	59	0,7	0,61
M47	2º	324	92	0,7	0,40
M48	1º	1048	>300	0,7	0,30
M49	2º	1728	>300	0,7	0,40
M50	1º	388	84	0,6	0,58
M51	2º	1824	>300	0,6	0,52

Obs.: Todos os recém-nascidos deste grupo foram IgM neonatal negativa.

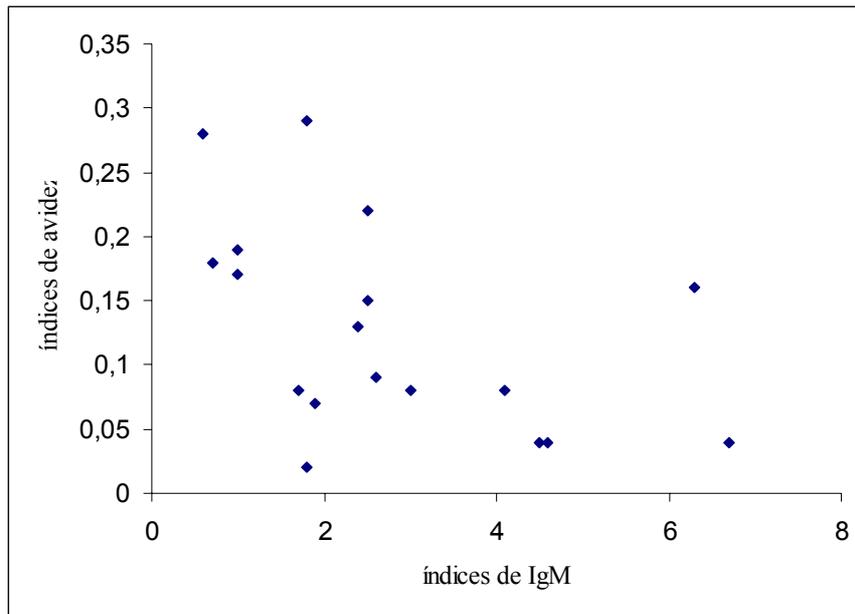


Figura 19 – A correlação moderada e inversa entre os índices de IgM e de avidez obtida nas amostras com baixa avidez ( $r = - 0.472$ ,  $p = 0.041$ )

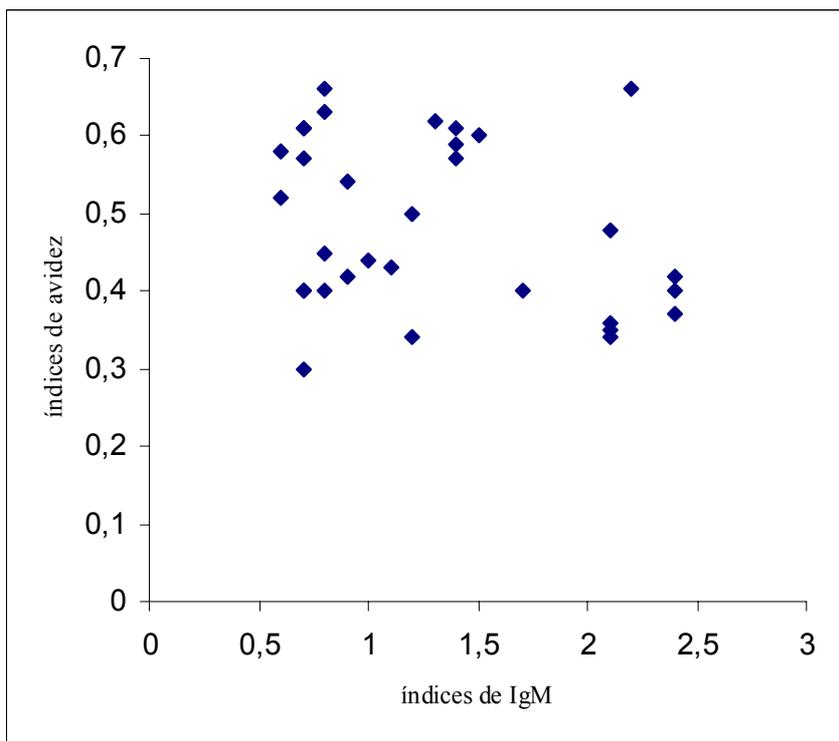


Figura 20 – A correlação não-significativa entre os índices de IgM e de avidez obtida nas amostras com alta avidez ( $r = - 0.275$ ,  $p = 0.128$ )

## DISCUSSÃO

Quando a triagem sorológica para toxoplasmose é realizada na gestante, a primeira amostra sérica é usualmente obtida na primeira visita da gestante ao pré-natal após a confirmação da gestação, usualmente entre a oitava e a 12<sup>a</sup> semanas de gestação. No Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, a primeira amostra sérica da gestante é freqüentemente obtida após a 20<sup>a</sup> semana de gestação, ou mesmo, como parturiente. Se a simples presença de IgM em amostras isoladas é o parâmetro usado para identificar infecção aguda, muitas gestantes serão erroneamente identificadas como provavelmente ou possivelmente infectadas de acordo com o sistema de classificação do grupo de trabalho do European Research Network on Congenital Toxoplasmosis (LEBECH et al, 1996) e desnecessariamente submetidas à amniocentese e/ou tratamento anti-parasitário.

Por estas razões, amostras isoladas IgG e IgM positivas foram analisadas em relação aos três parâmetros, IgG em UI/ml por MEIA e ELFA e índices de IgM e avides de IgG por ELFA. Os parâmetros foram comparados à infecção fetal determinada pela IgM neonatal, a fim de medir o risco de transmissão materno-fetal. A ausência de IgM neonatal em 32 recém-nascidos de mães com alta avides, baixos índices de IgM e mesmo níveis muito altos de IgG reforça a importância da avides alta para excluir risco de transmissão. É possível, no entanto, que tenha ocorrido um viés de seleção neste grupo, pois o número de partos de gestantes com

baixa avidéz foi cerca de duas vezes maior do que o número de partos de gestantes com alta avidéz. Em cinco recém-nascidos cujas mães tinham avidéz e IgG elevadas no segundo ou terceiro trimestres (M20, 24, 25, 26, 34), a IgM neonatal foi negativa e só os exames clínico e sorológico acurados nos primeiros 12 meses de vida poderiam excluir toxoplasmose congênita.

A presença de IgM neonatal em cinco crianças cujas mães tinham avidéz baixa e em um natimorto reforça a importância de avidéz baixa quanto ao risco de transmissão, quando medida em uma gestante IgM positiva. Altos índices de IgM (M1, M2 e M5) também salientam a importância dos índices de IgM quanto ao risco de transmissão. M3 e M4 tinham menos de 20 semanas e seus recém-nascidos foram IgM negativos, provavelmente porque o risco de transmissão é baixo na primeira metade da gestação. Estes recém-nascidos também deveriam ser acompanhados com exames clínico e sorológico nos primeiros 12 meses de vida até que a possibilidade de toxoplasmose congênita pudesse ser definitivamente confirmada ou descartada..

A avidéz pelo VIDAS foi padronizada e otimizada para excluir soroconversão recente em gestantes com índices elevados de IgM anti-*Toxoplasma* no primeiro trimestre da gestação (FLORI, 2004). A associação entre avidéz categorizada e transmissão ( $p < 0,001$ ) usando o valor de corte do fabricante de 0,2 aumenta quando este valor é reduzido para 0,15, com seis casos de transmissão em 12 gestantes e o Teste  $t$  de Student mostra que quanto menor a avidéz, maior a chance de transmissão ( $p < 0,001$ ). Estas informações podem ser de extrema relevância em obstetrícia, indicando a necessidade de iniciar o tratamento.

Sem avidéz, as crianças infectadas de M11 e M13 com baixos níveis de IgM poderiam não ter sido identificadas. Em um recém-nascido infectado (M13), o único parâmetro materno que sugeriu fortemente risco para o feto foi a avidéz. Estes são os resultados da sorologia convencional mais difíceis de correlacionar com transmissão, já que a IgM pode ser residual numa curva descendente.

A correlação moderada e inversa obtida entre os índices de IgM e de avidéz nas amostras com baixa avidéz (Figura 1) desta série ( $r = - 0.472$ ,  $p = 0.041$ ) é muito similar à correlação encontrada por Jenum et al (1997) entre os índices de avidéz e o tempo estimado de infecção ( $r = 0.46$ ). A correlação obtida entre os índices de IgM e de avidéz nas amostras com avidéz alta (Figura 2) nesta série ( $r = - 0.275$ ,  $p = 0.128$ ) não é significativa, portanto avidéz alta não mostra qualquer relação com IgM, provavelmente porque a resposta ao parasita é individual. Houve melhor associação de transmissão com avidéz ( $p < 0.001$ ) do que com IgM categorizada, índice maior do que 3.0 ( $p < 0.028$ ).

A dinâmica na produção de anticorpos deve ser lembrada na interpretação dos resultados maternos, especialmente em amostras isoladas. Considerando as técnicas de triagem usadas no Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, a sensibilidade do MEIA-IgG (CIMON, MARTY & MORIN, 1998) e o ensaio de captura do ELFA-IgM (CAMARGO, 2001), o risco de transmissão materno-fetal é relacionado ao tempo provável de aparecimento dos anticorpos: (1º) IgM > 3.0/ IgG < 20 UI/ml, (2º) IgM > 3.0/ IgG entre 20 e 300 UI/ml, (3º) IgM > 3.0/ IgG > 300 UI/ml, (4º) IgM < 3.0/ IgG positiva independente do nível. Estas são, portanto, as que mais se beneficiam dos resultados da avidéz, especialmente o quarto grupo, avidéz baixa indicando um risco maior de infecção congênita, avidéz alta um risco menor.

Alta avidéz, acima de 20%, na série de Jenum, Stray-Pedersen & Gundersen (1997) pode ser usada para excluir infecção aguda nas 20 semanas precedentes, o que reforça os achados de Lappalainen et al. que encontraram um valor preditivo de 100% para avidéz alta nos cinco meses precedente (LAPPALAINEN, KOSKINIEMI, HIILESMAA et al, 1995).

Na série de Flori et al (2004), o aumento dos índices de avidéz foi lento; o tempo médio para alcançar o limiar 0,3 foi de 14,2 meses. Nenhuma mulher atingiu este limiar nem aos quatro, nem aos seis meses após soroconversão. De acordo com os autores, é justificável diminuir o limiar para 0,2 para excluir uma infecção recente de menos de quatro meses e usar o limiar de 0,3 do fabricante para excluir infecções de menos de seis meses. A cinética do teste de avidéz em cinco grupos de mulheres quanto ao tipo e duração do tratamento também foi avaliada e não houve diferenças significativas quando comparações foram feitas entre os grupos.

A melhor estratégia para prevenir e controlar a infecção congênita pelo *Toxoplasma* não é clara. Na França, um país com alta prevalência da infecção, a prevenção é realizada com a triagem sorológica e com o acompanhamento das gestantes suscetíveis até o parto com sorologias mensais (BESSIÈRES, BERREBI, ROLLAND et al, 2001; LYNFIELD, HSU & GUERINA, 1999; ROBERT-GANGNEUX, GAVINET, ANCELLE et al., 1999). Soroconversão indica infecção aguda materna. Detecção do parasita no líquido amniótico pode ser realizada por cultura, inoculação em camundongo e PCR para confirmar infecção fetal.

O PCR para a detecção do *T. gondii* revolucionou o diagnóstico pré-natal permitindo que o feto infectado tenha diagnóstico precoce e não seja submetido a procedimentos mais invasivos, graças a sua sensibilidade, especificidade e rapidez (FORESTIER, HOHLFELD, SOLE et al, 1998; MONTOYA, 2002). No entanto, os resultados de um estudo colaborativo europeu mostraram a falta de homogeneidade entre diferentes protocolos de PCR e seus desempenhos, o que torna necessário um controle de qualidade externo (PELLOUX, GUY, ANGELICI et al, 1998). Há, também, marcadas diferenças quanto à sensibilidade relacionadas à idade gestacional no momento em que é realizada a amniocentese. PCR no líquido amniótico não é recomendado a mulheres HIV positivas, porque existe risco de transmissão do vírus ao feto durante o procedimento (MONTOYA, 2002).

Dunn et al (1999) analisaram o perfil de infecção congênita em 554 casos. A média de transmissão materno-fetal foi de 29%, que mascarou um aumento pronunciado no risco de 6% em 13 semanas para 72% em 36 semanas. Gestantes que fizeram a soroconversão entre 24 e 30 semanas tiveram o maior risco (10%) de ter uma criança infectada congenitamente com sinais clínicos precoces e em risco de complicações tardias.

A maioria das crianças infectadas não tem sinais da doença ao nascer, mas tem risco importante de desenvolver seqüelas tardias: retinocoroidite em mais de 85% crianças infectadas e anormalidades neurológicas. Redução marcada na frequência e na severidade da doença ao nascimento tem sido associada ao tratamento intra-útero. Redução significativa nas complicações tardias tem sido associada com extensão dos regimes de tratamento pós-natal iniciados no período neonatal ou como continuação dos regimes de tratamento intra-útero

(BESSIÈRES, BERREBI, ROLLAND et al, 2001; LYNFIELD, HSU & GUERINA, 1999; ROBERT-GANGNEUX, GAVINET, ANCELLE et al., 1999)

Apesar do uso de métodos mais avançados, alguns casos de toxoplasmose congênita não são detectados precocemente, o que salienta a importância do cuidadoso seguimento dos recém-nascidos em risco (ROBERT-GANGNEUX, GAVINET, ANCELLE et al., 1999). Na Dinamarca, um país com baixa prevalência da infecção, o programa de triagem neonatal baseado apenas na detecção de IgM específica a partir do cartão para PKU (fenilcetonúria) conseguiu identificar mais de 75% das crianças infectadas por gestantes que não foram tratadas (LEBECH, ANDERSEN, CHRISTENSEN et al, 1999). Esta estratégia pode ser a mais apropriada para países com baixa prevalência da infecção (GUERINA, HSU, MEISSNER et al, 1994; LEBECH, ANDERSEN, CHRISTENSEN et al, 1999). Nos Estados Unidos, uma amostra isolada, frequentemente obtida tardiamente no primeiro trimestre ou durante o segundo ou terceiro trimestre é a única fonte de informação sobre o risco fetal (WONG & REMINGTON, 1994)

Ricci et al (2003) compararam os resultados das duas abordagens em uma população com alta prevalência da infecção, com o objetivo de avaliar a efetividade destas estratégias em 5.288 gestantes suscetíveis, 188 identificadas como infectadas, e 9.730 recém-nascidos. Neste estudo, a triagem neonatal pareceu ser menos sensível que a pré-natal. Em um estudo realizado em Porto Alegre, a triagem neonatal identificou casos de toxoplasmose congênita adquirida e transmitida no final da gestação, não detectados pela triagem pré-natal (LAGO, NETO, MELAMED et al, 2003).

A prevalência da toxoplasmose congênita é alta em Porto Alegre, 6/10.000 [95%CI 1,3/10.000; 10,7/10.000] (LAGO, NETO, MELAMED et al, 2003). Programas de prevenção em amostras isoladas devem ser cuidadosamente avaliados. É necessário escolher as melhores combinações de testes (JENUM, STRAY-PEDERSEN & GUNDERSEN, 1997; ROBERTS, HEDMAN, LUYASU et al, 2001). Já que a avidéz tem sido largamente empregada como teste confirmatório, 117 casos de toxoplasmose na gestação divididos em categorias de risco de acordo com Lebech e col. (LEBECH, JOYNSON, SEITZ et al, 1996) foram reexaminados incluindo a avidéz, que foi capaz de definir 77 dos 117 casos (65,8%) com apenas uma amostra. A avidéz provou ser um método útil para classificar a infecção pelo *Toxoplasma* em uma única amostra, especialmente na gestação (ZOTTI, CHARRIER, GIACOMUZZI et al, 2004).

Um estudo multicêntrico europeu (ROBERTS, HEDMAN, LUYASU et al, 2001) analisou 20 testes que detectam anticorpos anti-*T. gondii* após infecção primária e suas combinações. Os critérios de seleção das amostras permitiram avaliar o desempenho dos testes em termos de sensibilidade e especificidade clínica, não analítica. Excelente desempenho foi obtido com o uso seqüencial de um método para IgM de grande sensibilidade seguido de um método que explora a qualidade da IgG (aglutinação diferencial e avidéz): especificidade diagnóstica clínica de cerca de 99%, mantendo sensibilidade de 95% ou superior. O pré-requisito positividade para IgG pode ter excluído amostras das duas primeiras semanas de infecção, quando nem todos os isotipos de anticorpos foram ainda expressos.

Para instituições públicas brasileiras, talvez o melhor modelo sorológico na prevenção da toxoplasmose congênita em amostras isoladas deva ser a pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM usando testes automatizados sensíveis e específicos, com ensaio de captura para

IgM, solicitada no início da gestação. A avidéz deve ser realizada em todas as sorologias IgM positivas. Avidéz alta auxilia a excluir infecção aguda nas últimas 20 semanas de gestação. Avidéz baixa é associada com risco de transmissão que aumenta com a idade gestacional, portanto, IgM neonatal deve ser solicitada em todas as sorologias maternas IgM positivas com baixa avidéz. Recém-nascidos negativos, mesmo assintomáticos, devem ser cuidadosamente acompanhados durante o primeiro ano de vida para excluir toxoplasmose congênita.

## **CONCLUSÕES**

Destes resultados pode-se concluir que a avidéz de IgG realizada em amostras isoladas de gestantes IgM positivas pode determinar o risco de transmissão em qualquer idade gestacional, especialmente se os índices dos dois testes forem analisados em relação à idade gestacional, sendo maior o risco quanto menor o índice de avidéz. Este modelo sorológico mostrou-se útil mesmo quando a sorologia foi solicitada tardiamente na gestação.

## REFERÊNCIAS

ALLAIN, J.-P.; PALMER, C.R.; PEARSON, G. et al. Epidemiological Study of Latent and Recent Infection by *Toxoplasma gondii* in Pregnant Women from a Regional Population in the U.K. **J. Infect.**, v. 36, p. 189-196, 1998.

A-MARTY, P.; LE-FICHOUX, Y.; DEVILLE, A. et al. Toxoplasmose congénitale et toxoplasmose gandlionnaire maternelle préconceptionnelle. **Presse Med.**, v. 20, n. 8, p. 387, 1991.

ASHBURN, D.; JOSS, A.W.L.; PENNINGTON, T.H. et al. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? **J. Clin. Pathol.**, v. 51, p. 312-5, 1998.

AUER, H.; VANDER-MÖSE, A.; PICHER, O. et al. Clinical and diagnostic relevance of the *Toxoplasma* IgG avidity test in the serological surveillance of pregnant women in Austria. **Parasitol. Res.**, v. 86, p. 965-70, 2000.

AZEVEDO, M.F.; MARTINS SILVA, A.A.; GUEDES, A.P.S. et al. Achados audiológicos na toxoplasmose congênita. **Acta Awho**, v. 19, n. 2, p. 96-101, 2000.

BERREBI, A.; KOBUCH, W.E.; BESSIÈRES, M.H. et al. Termination of pregnancy for maternal toxoplasmosis. **Lancet**, v. 344, p. 36-9, 1994.

BESSIÈRES, M.H.; ROQUES, C.; BERREBI, A. et al. IgA antibodies response during acquired and congenital toxoplasmosis. **J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 605-8, 1992.

BESSIÈRES, M.H.; BERREBI, A.; ROLLAND, M. et al. Neonatal screening for toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. **Europ. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 94, p. 37-45, 2001.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do Protozoan Parasites Survive Inside Macrophages? **Parasitol. Today**, v. 15, n. 1, p. 22-28, 1999.

BOHNE, W.; HOLPERT, M.; GROSS, U. Stage Differentiation of the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. **Immunology**, v. 201, p. 248-54, 1999.

BUFFOLANO, W.; BEGHETTO, E.; Pezzo et al. Use of Recombinant Antigens for Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5916-24, 2005.

CAMARGO, M.E. Toxoplasmose. In: FERREIRA, A.W., ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001.

CHUMPITAZI, B.F.F.; BOUSSAID, A.; PELLOUX, H. et al. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by Immunoblotting and Relationship with Others Methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 6, p. 1479-85, 1995.

CIMON, B.; MARTY, P.; MORIN, O. et al. Specificity of Low Anti-Toxoplasma IgG Titers with IMx and AxSYM Toxo IgG Assays. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 32, p. 65-7, 1998.

COZON, G.J.N.; FERRANDIZ, J.; NEBHI, H. et al. Estimation of the Avidity of Immunoglobulin G for Routine Diagnosis of Chronic *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnant Women. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 17, p. 32-36, 1998.

COUVREUR, J.; DESMONTS, G.; TOURNIER, G. et al. Etude d'une série homogène de 210 cas de toxoplasmose congénitale chez des nourrissons âgés de 0 à 11 mois et dépistés de façon prospective. **Ann. Pediatr.**, v. 31, p. 815-9, 1984.

DAFFOS, F.; FORESTIER, F.; CAPELLA-PAVLOVSKY, M. et al. Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 318, p. 271-5, 1988.

DARDÉ, M.L.; VILLENA, I.; PINON, J.M. et al. Severe Toxoplasmosis Caused by a *Toxoplasma gondii* Strain with a New Isoenzyme Type Acquired in French Guyana. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 1, p. 3423-24, 1998.

DEL VADO, G. Toxoplasmosis congénita: seguimiento durante 15 años en Córdoba (Argentina). **Arch. argent. Pediatr.**, v. 95, p. 14-20, 1997.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis - A prospective study of 378 pregnancies. **N. Engl. J. Med.**, v. 290, p. 1110-6, 1974.

DESMONTS, G.; NAOT, Y. and REMINGTON, J.S. Immunoglobulin M – Immunosorbent Agglutination Assay for diagnosis of Infections Diseases: diagnosis of Acute Congenital and Acquired *Toxoplasma* Infectious. **J. Clin. Microbiol.**, v. 14, n. 5, p. 486-91, 1981.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. Toxoplasmose congénitale. Etude prospective de l'issue de la grossesse chez 542 femme atteintes de toxoplasmose acquise en cours de gestation. **Ann. Pediatr.**, v. 31, n. 10, p. 805-9, 1984.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J.; THULLIEZ, P.H. Toxoplasmose Congénitale: cinq cas de transmission à l'enfant d'une infection maternelle antérieure à la grossesse. **Presse Med.**, v. 19, n. 31, p. 1445- 9, 1990.

DOLLFUS, H.; DUREAU, P.; HENNEQUIN, C. et al. Congenital toxoplasma chorioretinitis transmitted by preconceptionally immune woman. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 82, p.1444-8, 1998.

DUARTE, F.C.P.R.; TESSARO, M.M.; REIS, M.M. Toxoplasmose: Teste de Avidéz de IgG e Risco de Transmissão Vertical no Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas (HMIPV) em Porto Alegre. **NewsLab**, v. 50, p.134-148, 2002.

DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F. et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **Lancet**, v. 353, p. 1829-33, 1999.

DUPOUY-CAMET, J.; LAVAREDA DE SOUZA, S.; MASLO, C. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in Venous Blood from AIDS Patients by Polymerase Chain Reaction **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 7, p. 1866-9, 1993.

ELSAID, M.M.A.; MARTINS, M.S.; FRÉZARD, F. et al. Vertical Toxoplasmosis in a Murine Model. Protection after Immunization with Antigens of *Toxoplasma gondii* Incorporated into Liposomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 99-104, 2001.

EVENGÄRD, B.; LILJA, G.; CAPRARU, T. et al. A Retrospective Study of Seroconversion against *Toxoplasma gondii* during 3000 Pregnancies in Stockolm. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 31, p. 127-9, 1999.

EVENGÄRD, B.; PETERSSON, K.; ENGMAN, M.-L. et al. Low incidence of toxoplasma infection during pregnancy and newborns in Sweden. **Epidemiol Infect**, v. 127, p.121-7, 2001.

FAY, O.; LEYE, A., DIENG Y. et al. Toxoplasmosis in Dakar. Seroepidemiologic sampling of 353 women of reproductive age. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 91, n. 3. p. 249-50, 1998.

FARIA COUTO, J.C. Toxoplasmose e Gestação. **Femina**, v. 26, n. 9, p. 753-9, 1998.

FERREIRA, A.W.; CAMARGO, M.E. Toxoplasmosis and the laboratory: diagnosis and a constant striving for improvement. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 44, p. 119-120, 2002.

FLORI, P.; TARDY, L.; PATURAL, H. et al. Reliability of Immunoglobulin G Antitoxoplasma Avidity Test and Effects of Treatment on Avidity Indexes of Infants and Pregnant Women. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 11: 669-674, 2004.

FORESTIER, F.; HOHLFELD, P.; SOLE, Y. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by PCR: extended experience. **Prenat. Diagn.**, v. 18, p. 405-15, 1998.

FOULON, W.; NAESSENS, A.; LAUWERS, S. et al. Impact of primary prevention on the incidence of toxoplasmosis during pregnancy. **Obstet. Gynecol.**, v. 72, p. 363-6, 1988.

FOULON, W.; VILLENA, I.; STRAY-PEDERSEN, B. et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 180, p. 410-5, 1999.

FRANCIS, J.M.; JOYSON, D.M.H. Duration of specific immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by enzyme immunoassay and immunosorbent agglutination assay. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.**, v. 12, p. 556-9, 1993.

FUX, B.; FERREIRA, A.M.; CASSALI, G.D. et al. Experimental Toxoplasmosis in BALB/c Mice. Prevention of Vertical Disease Transmission by Treatment and Reproductive Failure in Chronic Infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p.121-6, 2000.

GAVINET, M.F.; ROBERT, F.; FIRTION, G. et al. Congenital Toxoplasmosis Due to Maternal Reinfection during Pregnancy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 5, p.1276-7, 1997.

GAZZINELLI, R.; XU, Y.; HIENY, S. et al. Simultaneous Depletion of CD4+ And CD8+ Lymphocytes is Required to Reactivate Chronic Infection with *Toxoplasma Gondii*. **J. Immunol.**, v. 149, n. 1, p. 175-180, 1992.

GILBERT, R.E.; GRAS, L.; WALLON, M. et al. Effect of prenatal treatment on mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*: retrospective cohort study of 554 mother-child pairs in Lyon, France. **Int. J. Epidemiol.**, v. 30, p. 1303-8, 2001.

GORGIEVSKI-HRISOHO, M.; GERMANN, D.; MATTER, L. Diagnostic Implications of Kinetics of Immunoglobulin M and A Antibody Responses to *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1506-11, 1996.

GOUBET, S.; PELLOUX, H.; FRICKER-HIDALGO, H. et al. Sérodiagnostic de la toxoplasmose: comparaison de la trousse Elisa Axsym® (Abbott) avec la trousse Vidas® (bioMérieux), l'immunofluorescence indirecte et l'Isaga. **Ann. Biol. Clin.**, v. 57, p. 481-4, 1999.

GRAS, L.; GILBERT, R.E.; ADES, A.E. and DUNN, D.T. Effect of prenatal treatment on the risk of intracranial and ocular lesions in children with congenital toxoplasmosis. *Internat. J. Epidemiol.* v. 30, p. 1309-13, 2001.

GRAS, L.; GILBERT, R.E.; WALLON, M. et al. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. **Epidemiol. Infect.**, v. 132, n. 3, p. 541-8, 2004.

GRECO, P.; VIMERCATI, A.; ANGELICI, M.C. et al. Toxoplasmosis in pregnancy is still an open subject. **J. Perinat. Med.**, v. 31, p. 36-40, 2003.

GROSS, U.; LÜDER, C.G.K.; HENDGEN, V. et al. Comparative Immunoglobulin G Antibody Profiles between Mother and Child (CGMC Test) for Early Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 10, p. 3619-22, 2000.

GUARDIOLA, C.F.; CÉRON, M.C.C. Prevalencia de Infestación por *Toxoplasma gondii* en un Grupo de Madres y sus Productos de Gestación. **Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.**, v. XXXIV, n. 3, p. 178-190, 1981.

GUERINA, N.G.; HSU, H.-W.; MEISSNER, H.C. et al. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. New England Regional Toxoplasma Working Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, n. 26, p. 1858-63, 1994.

GUERINA, N.G.; HSU, H.-W.; LYNFIELD, R. Screening methods for congenital toxoplasmosis and risk of disease. **Lancet**, v. 353, p. 1899-1990, 1999.

HARTUP, C.; JOHNSON, J.D.; HOLLIMAN, R.E. The Investigation of *Toxoplasma* Infection Associated with Pregnancy. **J. Infect.**, v. 35, p. 47-54, 1997.

HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPÄLÄ, I. et al. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. Infect. Dis.**, v. 159, p. 736-40, 1989.

HEYNEMAN, D. Parasitologia Médica. In: BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; NICHOLAS ORNSTON, L. **Microbiologia Médica. 20. ed.** Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998.

HELFGOTT, A. TORCH Testing in HIV-Infected Women. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 42, n. 1, p. 149-62, 1999.

HENNEQUIN, C.H.; DUREAU, P.; N'GUYEN, L. et al. Congenital toxoplasmosis acquired from an immune woman. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, p. 75-7, 1997.

HOHLFELD, P.; DAFFOS, F.; COSTA, J.M. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase chain reaction test on amniotic fluid. **N. Engl. J. Med.**, v. 33, p. 695-9, 1994.

HOLLIMAN, R.E.; RAYMOND, R.; RENTON, Net al. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. **Epidem. Infect.**, v. 112, p. 399-408, 1994.

JONES, J.L.; DIETZ, V.J.; POWER. M. et al. Survey of Obstetrician-Gynecologists in the United States About Toxoplasmosis. **Infect. Dis. Obstet. Gyneol.**, v. 9, p. 23-31, 2001.

JONES, J.; LOPEZ, A.; WILSON. M. Congenital toxoplasmosis. **Am. Fam. Physician**, v. 67, n. 10, p. 2131-8, 2003.

JENUM, P.A.; STRAY-PEDERSEN, B.; GUNDERSEN, A.G. Improved Diagnosis of Primary *Toxoplasma gondii* Infection in Early Pregnancy by Determination of Antitoxoplasma Immunoglobulin G Avidity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 8, p. 1972-77, 1997.

JENUM, P.A.; KAPPERUD, G.; STRAY-PEDERSEN, B. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* specific immunoglobulin G antibodies among pregnant women in Norway. **Epidemiol. Infect.**, v. 120, p. 87-92, 1998.

JENUM, P.A.; STRAY-PEDERSEN, B. Development of Specific Immunoglobulins G, M, A Following Primary *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnant Women. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 10, p. 2907-13, 1998.

KANG, H.; REMINGTON, J.S.; SUZUKI, Y. Decreased Resistance of B Cell-Deficient Mice to Infection with *Toxoplasma gondii* Despite Unimpaired Expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and Inducible Nitric Oxide Synthase. **J. Immunol.**, v. 164, p. 2629-34, 2000.

KARUNAJEEWA, H.; SIEBERT, D.; HAMMOND, R. et al. Seroprevalence of varicella zoster virus, parvovirus B19 and *Toxoplasma gondii* in a Melbourne obstetric population: implications for management. **Aust. N. Z. J. Obstet. Gynecol.**, v. 41, n. 1, p. 23-8, 2001.

LAGO, E.G.; NETO, E.C.; MELAMED, J. et al. - Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in Porto Alegre, RS, Brazil. In: Proceedings of the International Conference on Toxoplasmosis, 2003, Copenhagen. **ANAIS**, Copenhagen: The Panum Institute, University of Copenhagen, 2003.

LAPPALAINEN, M.; SINTONEN, H.; KOSKINIEMI, M. et al. Cost-benefit Analysis of Screening for Toxoplasmosis during Pregnancy. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 27, p. 265-72, 1995.

LAPPALAINEN, M.; KOSKINIEMI, M.; HIILESMAA, V. et al and The Study Group. Outcome of children after maternal primary *Toxoplasma* infection during pregnancy with emphasis on avidity of specific IgG. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 14, n. 5, p. 354-61, 1995.

LEÃO, P.R.D. Toxoplasmose e Gravidez. **Femina**, v. 30, n. 2, p. 99-102, 2002.

LEBECH, M.; JOYNSON, D.H.; SEITZ, M. et al. Classification and case definitions of *T. gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 15, p. 799-805, 1996.

LEBECH, M.; ANDERSEN, O.; CHRISTENSEN, N.C. et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasmosis infection in the absence of prenatal treatment. Danish congenital toxoplasmosis study group. **Lancet**, v. 353, p. 1834-7, 1999.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D.J.P.; GRIGG, M.E. et al. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 1285-92, 2001.

LI, S.; MAINE, G.; SUZUKI, Y. et al. Serodiagnosis of Recent Acquired *Toxoplasma gondii* Infection with a Recombinant Antigen. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 179-184, 2000.

LI, S.; GALVAN, G.; ARAUJO, F. et al. Serodiagnosis of Recently Acquired *Toxoplasma gondii* Infection Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Combination of Recombinant Antigens. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, n. 5, p. 781-7, 2000.

LIESENFELD, O.; PRESS, C.; FLANDERS, R. et al. Study of Abbott Toxo IMx System for Detection of Immunoglobulin G and Immunoglobulin M *Toxoplasma* Antibodies: Value of Confirmatory Testing for Diagnosis of Acute Toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 10, p. 2526-30, 1996.

LIESENFELD, O.; PRESS, C.; MONTOYA, J.G. et al. False-Positive Results in Immunoglobulin M (IgM) *Toxoplasma* Antibody Tests and Importance of Confirmatory Testing: the Platelia Toxo IgM Test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 1, p. 174-8, 1997.

LIESENFELD, O.; MONTOYA, J.G.; TATHINENI, N.J. et al. Confirmatory serology testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive *Toxoplasma* immunoglobulin M antibody titers. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 184, p. 140-5, 2001.

LIESENFELD, O.; MONTOYA, J.G.; KINNEY, S. et al. Effect of Testing for IgG Avidity in the Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnant Women: Experience in a US Reference Laboratory. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 1248-53, 2001.

LOGAR, J.; NOVAK-ANTOLIC, Z.; ZORE, A. Specific IgG Avidity - A Supplementary Assay in Serological Screening for Toxoplasmosis in Pregnancy. **J. Infect.**, v. 38, n. 1, p. 61-3, 1999.

LOPEZ, A.; DIETZ, V.J.; WILSON, M. et al. Division of Parasitic Diseases, National Center for Infectious Diseases - Preventing Congenital Toxoplasmosis. **M.M.W.R.**, v. 49, n. RR02, p. 57-75, 2000.

LÜDER, C.G.K.; SEEBER, F. *Toxoplasma gondii* and MHC-restricted antigen presentation: on degradation, transport and modulation. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 1355-69, 2001.

LYNFIELD, R.; HSU, H.-W.; GUERINA, N.G. Screening methods for toxoplasma and risk of disease. **Lancet**, v. 353, p.1899-1900, 1999.

LYONS, R.E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C.W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 5, p. 198-201, 2002.

MARCOLINO, P.T.; SILVA, D.A.O.; LESER, P.G. et al. Molecular Markers in Acute and Chronic Phases of Human Toxoplasmosis: Determination of Immunoglobulin G Avidity by Western Blotting. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 384-9, 2000.

MARTIN, V.; ARCAVI, M.; SANTILLAN, G. et al. Detection of Human *Toxoplasma* - Specific Immunoglobulins A, M, and G with a Recombinant *Toxoplasma gondii* Rop2 Protein. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, n. 5, p. 627-31, 1998.

MARTY, P.; BONGAIN, A.; THULLIEZ, P. et al. Prenatal diagnosis of severe fetal toxoplasmosis as a result of toxoplasmic reactivation in a HIV-seropositive woman. **Prenatal Diagn.**, v. 14, p. 414-5, 1994.

MCAULEY, J.; BOYER, K.M.; 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.**, v. 18, p. 38-72, 1994.

MELAMED, J.; RAFFIN, N.N.; AGNES, M.J. Toxoplasmose no Rio Grande do Sul. Inquérito sorológico no interior do Estado. **Rev. Pat. Trop.**, v. 10, p.1-7, 1981.

MELAMED J. Peculiaridades da toxoplasmose ocular no Rio Grande do Sul, Brazil. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 51, n. 5, p.197-200, 1988.

MELAMED, J. Retinocoroidite toxoplásmica. Belo Horizonte, 1991.(Tese de doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais).

MELAMED, J.; SEBEN, J.C.; MAESTRI, M.; SILVEIRA, S. e CLAUDETE, L. Epidemiology of ocular toxoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil. In: **Proceedings of the Third International Symposium on Uveites**, 1992 a, Belgium, p.211-14.

MELAMED, J. Clinical Appearance of Toxoplasmic retinochoroiditis. In: **Proceedings of the Third International Symposium on Uveites**, 1992 b, Belgium, p.283-8.

MELAMED, J.; ARAÚJO, C.H.; SARAIVA, P.; FERREIRA, J. Toxoplasmosis: Seroepidemiological Structure in Southern Brazil. In: **Proceedings of the Fifth International Symposium on Uveitis**, 2000, Buenos Aires, p. 269-72.

MELLO, F.G.; ROSSI, C.L. Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-Elisa) for Evaluating IgG Antibody Avidity in Toxoplasmosis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 39, n. 4, p. 235-6, 1997.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O.; KINNEY, S. et al. VIDAS Test for Avidity of *Toxoplasma*-specific Immunoglobulin G for Confirmatory Testing of Pregnant Women. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 7, p. 2504-8, 2002.

MONTOYA, J.G. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. S73-S82, 2002.

MOREIRA DE SÁ, R.A.; BROCHINI JÚNIOR, M.; CHAVES NETO, H. Toxoplasmose Congênita. **J. Bras. Ginecol.**, v. 107, n. 8, p. 281-6, 1997.

MOZZATTO, L.; PROCIANOY, R.S. Incidência de toxoplasmose congênita no sul do Brasil: estudo prospectivo. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 45, n.3, p.147-51, 2003.

MUÑOZ, P.; BAHAMONDE, M.I.; REYES, V. et al. Toxoplasmosis congenita. un problema vigente en Chile. Analisis de 15 casos clínicos. **Rev. Chile. Infect.**, v. 12, n. 1, p. 19-26, 1995.

NABIAS, R.; NGOUAMIZOKOU, A.; MIGOT-NABIAS, F. , et al. Enquête sérologique sur la toxoplasmose chez les consultantes du centre de P.M.I. de Franceville (Gabon). **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 91, n. 4, p. 318-320, 1998.

NAESSENS, A.; HEUNINCKX, W.; FOULON, W. et al. Evaluation of seven commercially available enzyme immunoassays for immunoglobulin G and M antibody detection of *Toxoplasma gondii*. **Immunol. Infect. Dis.**, v. 3, p.258-62, 1993.

NAESSENS, A.; JENUM, P.A.; POLLAK, A. et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: A multicenter avaluation. **J. Pediatr.**, v. 135, n. 6, 714-9, 1999.

NEVES, J.M.; NASCIMENTO, L.B.; RAMOS, J.G.L. et al. Toxoplasmose na Gestação. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 16, n. 6, p. 197-202, 1994.

NETO, E.C.; ANELE, E.; RUBIM, R. et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-years prospective neonatal screening study. **Int. J. Epidemiol.**, v. 29, p. 941-7, 2000.

NEWTON, E.R. Diagnosis of Perinatal TORCH Infections. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 42, n. 1, p. 59-70, 1999.

OLIVEIRA-BAHIA, L.M.G.; ABREU, A.M.W.; AZEVEDO-SILVA, J. et al. Highly endemic, waterborn toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 55-62, 2003.

PAUL, M. Immunoglobulin G Avidity in Diagnosis of Toxoplasmic Lymphadenopathy and Ocular Toxoplasmosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 514-8, 1999.

PELLOUX, H.; CIAPA, P.; GOULLIER-FLEURET, A. et al. Évaluation du système Vidas pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose. **Ann. Biol. Clin.**, v. 50, p.875-8, 1993.

PELLOUX, H.; BRUN, E.; VERNET, G. et al. Determination of Anti-*Toxoplasma gondii* Immunoglobulin G Avidity: Adaptation to the Vidas System (bioMérieux). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 32, p. 69-73, 1998.

PELLOUX, H.; GUY, E.; ANGELICI, M.C. et al. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 165, p. 231-7, 1998.

PETERSSON, K.; STRAY-PEDERSEN, B.; MALM, G. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Sweden. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 79, p. 824-9, 2000.

PETRY, L.C.; TESSARO, M.M.; GUEDES, C.R. e col. Análise dos Resultados da Sorologia para Toxoplasmose em Gestantes do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas (HMIPV) em Porto Alegre, RS, utilizando a Pesquisa de Anticorpos Específicos pelo ELFA, Sistema VIDAS®, bioMérieux. **NewsLab**, v. 42, p. 114-120, 2000.

PINON, J.M.; THOANNES, H.; GRUSON, N. et al. An enzyme-linked immunofiltration assay used to compare infant and maternal antibodies profiles in toxoplasmosis. **J. Immunol. Methods**, v. 77, p. 15-23, 1985.

PINON, J.M.; FOU DRINIER, F.; MONGEOT, G. et al. Evaluation of Risk and Diagnostic Value of Quantitative Assays for Anti-*Toxoplasma gondii* Immunoglobulin A (IgA), IgE, and IgM and Analytical Study of Specific IgG in Immunodeficient Patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 878-84, 1995.

PINON, J.M.; 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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 6, p. 2267-71, 2001.

PONS, J.C.; SIGRAND, C.; GRANGEOT-KEROS, L. et al. Congenital toxoplasmosis: mother-to-fetus transmission of pre-pregnancy infection. **Presse Med.**, v. 24, p. 179-182, 1995.

PRABHAKAR, P.; BAILEY, A.; SMIKLE, M.F. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, Rubella virus, Cytomegalovirus, Herpes simplex virus (TORCH) and Syphilis in Jamaican Pregnant Women. **Caribbean Epidemiology Centre Report (CAREC) PAHO/WHO**, p. 166-9, 1986.

PRATLONG, F. Toxoplasmose et grossesse: le point sur le suivi sérologique. **Gynécol. Obstét. Fétil.**, v. 30, p. 237-43, 2002.

PRIGIONE, I.; FACCHETTI, P.; LECORDIER, L. et al. T Cell Clones Raised from Chronically Infected Healthy Humans by Stimulation with *Toxoplasma gondii* Excretory-Secretory Antigens Cross-React with Live Tachyzoites: Characterization of the Fine Antigenic Specificity of the Clones and Implications for Vaccine Development. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3741-8, 2000.

PUJOL-RIQUÉ, M.; QUINTÓ, L.; DANES, C. et al. Dating anti-*Toxoplasma* IgM in pregnancy using VIDAS-ELFA methods. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 18, n. 6, p. 274-8, 2000.

REDLICH, A.; MÜLLER, W.A. Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigen GRA6 in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Parasitol. Res.**, v. 84, p. 700-6, 1998.

REIS, M.M. Diagnóstico Sorológico da toxoplasmose na Gestante e no Recém-Nascido. **Tópico de Patologia Clínica do Weinmann Laboratório**, n. 116, 1996.

REIS, M.M. **Testes Imunológicos: Manual ilustrado para profissionais da saúde**. 1. ed. Porto Alegre: AGE, 1998.

REIS, M.M. **Infecções congênitas - Diagnóstico sorológico. Manual para profissionais da saúde**. Apontamentos do Setor de Imunologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, Secretaria Municipal da Saúde de Porto Alegre, 2001.

REIS, M.M.; d'AZEVEDO, P.A.; SILVA, J.C, TESSARO, M.M. Níveis de anticorpos específicos anti-*T.gondii* em amostras seqüenciais de gestantes do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas em Porto Alegre, RS. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 22, 2003, Florianópolis. **ANAIS**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003a. p.146.

REIS, M.M.; d'AZEVEDO, P.A.; SILVA, J.C, TESSARO, M.M. Toxoplasmose na gestação: IgM inconclusiva ou reagente? IgG não reagente, infecção aguda ou falso reagente? In: Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial, 37, 2003, Rio de Janeiro. **ANAIS**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, 2003b. p.159.

REIS, M.M.; d'AZEVEDO, P.A.; SILVA, J.C, TESSARO, M.M. Toxoplasmose na gestação: comparação dos níveis de IgG entre o ELFA, Sistema VIDAS<sup>®</sup>, Biomérieux e o MEIA, Sistema AXSYM<sup>®</sup>, Abbott. In: Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial, 37, 2003, Rio de Janeiro. **ANAIS**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, 2003c. p.161.

REIS, R.; LÖSCH, R.; LAGO, E. Prevenção Primária da Toxoplasmose Congênita. **Acta Méd.**, v. 20, p.704-20, 1999.

REMINGTON, J.S.; McLEOD, R.; TULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J. **Infections diseases of the fetus and newborn infant**. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2001.

RICCI, M.; PENTIMALLI, H.; THALLER, R. et al. Screening and prevention of congenital toxoplasmosis: an effectiveness study in a population with a high infection rate. **J. Matern. Fetal Neonatal Med.**, v. 14, n. 6, p. 398-403, 2003.

ROBERT-GANGNEUX, F.; COMMERE, V.; TOURTE-SCHAEFER, C. et al. Performance of a Western Blot Assay to Compare Mother and Newborn Anti-Toxoplasma Antibodies for the Early Neonatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 18, p. 648-54, 1999.

ROBERT-GANGNEUX, F.; GAVINET, M.-F.; ANCELLE, T.; et al. Value of Prenatal Diagnosis and Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Retrospective Study of 110 Cases. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 9, p. 2893-8, 1999.

ROBERTS, A.; HEDMAN, K.; LUYASU, V. et al. Multicenter Evaluation of Strategies for Serodiagnosis of Primary Infection with *Toxoplasma gondii*. **Eur. J. Microbiol. Dis.**, v. 20, p. 467-74, 2001.

ROMAN, S.; WALLON, M.; FRANCK, J. et al. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. **Obstet. Gynecol.**, v. 97, p. 296-300, 2001.

RUSKIN, J.; REMINGTON, J. Toxoplasmosis in the compromised host. **Ann. Inter. Med.**, v. 84, p.193-9, 1976.

SABIN, A.B. & FELDMAN, H.A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). **Science** 108: p.660, 1948.

SAYLES, P.C.; GIBSON, G.W.; JOHNSON, L.L. B Cells Are Essential for Vaccination-Induced Resistance to Virulent *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immunol.**, v. 68, n. 3, p.1026-33, 2000.

SEGUNDO, G.R.S.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R. et al. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 13-7, 2004.

SENSINI, A.; PASCOLI, S.; MARCHETTI, D. et al. IgG avidity in the serodiagnosis of acute *Toxoplasma gondii* infection: a multicenter study. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 2, p. 25-9, 1996.

SILVEIRA, C. A. M. **Estudo da toxoplasmose ocular na região de Erechim-RS**. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1997. Dissertação (doutorado), Universidade Federal de São Paulo, 1997.

SKLENAR, I.; JONES, T.C.; ALKAN, S. et al. Association of Symptomatic Human Infection with *Toxoplasma gondii* with Imbalance of Monocytes and Antigen-Specific T cell Subsets. **J. Infect. Dis.**, v. 153, n. 2, p. 315-24, 1986.

SORENEN, T.; SPENTER, J.; JALIASHVILI, I. et al. Automated time-resolved immunofluorometric assay for *Toxoplasma gondii*-specific IgM and IgA antibodies: study of more than 130,000 filter-paper blood-spot samples from newborns. **Clin. Chem.**, v. 48, n. 11, p. 1981-6, 2002.

SPALDING, S.M.; AMENDOEIRA, M.R.R.; COELHO, J. et al. Otimização da reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 38, n. 2, p. 105-10, 2002.

SPADONI, V. S.; MELAMED, J.; PARISE, C. et al. Ocular manifestations of congenital toxoplasmosis. In: ANAIS EM CD-ROM DO Congresso Mundial de Oftalmologia, São Paulo, 2006.

SUKTHANA, Y. Difference of *Toxoplasma gondii* antibodies between Thai and Austrian pregnant women. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 30, n. 1, p. 38-41, 1999.

SUSANTO, L.; MULJONO, R. Preparation of *Toxoplasma gondii* RH strain antigen. antigen analysis and antigen detection in sera: a review. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 32, n. 2, p.195-201, 2001.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M.A.; SCHREIBER, R.D. et al. Interferon- $\gamma$ : The Major Mediator of Resistance Against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, p.516-8, 1988.

SUZUKI, Y.; RAMIREZ, R.; PRESS, C. et al. Detection of Immunoglobulin M Antibodies to P35 Antigen of *Toxoplasma gondii* for Serodiagnosis of Recently Acquired Infection in Pregnant Women. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 11, p. 3967-70, 2000.

SUZUKI, L.A.; ROCHA, R.J.; ROSSI, C.L. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 62-70, 2001.

THIERMANN, E.; MUÑOZ, P.; ATIAS, A. Transmisión congénita de *Toxoplasma gondii* durante la fase crónica en mujeres inmunocomprometidas. **Rev. Chil. Infect.**, v. 13, p.154-160, 1996.

TUUMINEN, T.; SEPPÄNEN, H.; PITKÄNEN, E.-M. et al. Improvement of Immunoglobulin M Capture Immunoassay Specificity: *Toxoplasma* Antibody Detection Method as a Model. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 1, p. 270-3, 1999.

VILLENA, I.; CHEMLA, C.; QUEREUX, C. et al. Prenatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis Transmitted By an Immunocompetent Woman Infected Before Conception. **Prenat. Diagn.**, v. 18, p. 1079-81, 1998.

VOGEL, N.; KIRISITS, M.; MICHAEL, E. et al. Congenital Toxoplasmosis Transmitted from an Immunologically Competent Mother Infected Before Conception. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, p.1055-60, 1996.

WALLON, M.; PEYRON, F.; LEBECH, M. et al. Prenatal treatment and the risk of congenital toxoplasmosis: preliminary findings from two cohort studies. **Pediatric Res.**, v. 42, p. 400, 1997.

WALLON, M.; LIOU, C.; GARNER, P. et al. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. **Brit. Med. J.**, v. 318, p. 1511-4, 1999.

WALLON, M.; FRANCK, J.; ROMAND, S. et al. Intérêt de la sérologie toxoplasmique à l'accouchement chez les femmes séronégatives pendant la grossesse. **J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.**, v. 30, p. 697-9, 2001.

WILSON, J.M.; JUNGER, G. Principles and practice for screening for disease. WHO: Geneve, Public Health Paper n. 4, 1968.

WILSON, M.; SCHANTZ, P.M.; TSANG, V.C.W. Clinical Immunoparasitology. In: ROSE, N.R.; MACARIO, E.C.; FOLDS, J.D.; CLIFFORD LANE, H.; NAKAMURA, R.M. 2.ed. **Manual of Clinical Laboratory Immunology**. Washington: American Society for Microbiology, 1997.

WILSON, M.; REMINGTON, J.S.; CLAVET, C. et al. Evaluation of six commercial kits for detection of Human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 311-25, 1997.

WIRDEN, M.; BOTTEREL, F.; ROMAND, S. et al. Intérêt du dépistage en post-partum de la toxoplasmose congénitale après primo-infection maternelle en fin de grossesse. **J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.**, v. 28, p. 566-7, 1999.

WONG, S.Y.; HADJU, M.-P.; RAMIREZ, R. et al. Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis **J. Clin. Microbiol.** v.31, p. 2952-9, 1993.

WONG, S.Y.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 853-61, 1994.

YAP, G.S.; SHER, A. Cell-mediated Immunity to *Toxoplasma gondii*: Initiation, Regulation and Effector Function. **Immunology**, v. 201, p. 240-7, 1999.

ZENNER, L.; ESTAQUIER, J.; DARCY, F. et al. Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. **Parasite Immunol.**, v. 21, p. 261-72, 1999.

ZOTTI, C.; CHARRIER, L.; GIACOMUZZI, M. *et al.* - Use of Avidity test in case definition of toxoplasmosis in pregnancy. **New Microbiol.**, **27**: 17-20, 2004.

ZUFFEREY, J.; HOHLFELD, P.; BILLE, J. *et al.* Value of the comparative enzyme-linked immunofiltration assay for early neonatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 18, n. 11, p. 971-5, 1999

#### **OBRA CONSULTADA**

FURASTE, P.A. **Normas Técnicas para o Trabalho Científico. 13. ed.** Porto Alegre: Brasil, 2005.

## ANEXO A

### **Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes de um hospital público de Porto Alegre. Serologic profile of toxoplasmosis in pregnant women from a public hospital in Porto Alegre.**

Myrian Morussi Reis <sup>1</sup>

Maria Madalena Tessaro <sup>2</sup>

Pedro Alves d'Azevedo <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Médica responsável pelo Setor de Imunologia do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, professora do Departamento de Microbiologia e Parasitologia e Imunologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA) e mestranda do Curso de Pós-Graduação em Patologia Clínica da FFFCMPA.

<sup>2</sup> Bióloga do Setor de Imunologia do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas.

<sup>3</sup> Bioquímico, professor do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia da FFFCMPA, Doutor em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro e orientador na dissertação de mestado de Myrian Morussi Reis.

#### **Correspondência:**

Myrian Morussi Reis

Rua Hilário Ribeiro, nº 15, 202, bairro Moinhos de Vento, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP 90 510-040

*e-mail:* [gbsimoes@uol.com.br](mailto:gbsimoes@uol.com.br)

telefone: (51) 32 22 86 33

Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, endereço:

Avenida Independência, nº 661, bairro Independência, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP 90 035-07

## Resumo

**Objetivo:** Descrever e analisar os resultados da sorologia convencional para toxoplasmose em gestantes acompanhadas pelo pré-natal do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas em Porto Alegre. **Métodos:** IgG e IgM específicas foram processadas por testes fluorométricos, sendo a IgM de captura. Nova coleta em duas a três semanas foi solicitada às gestantes IgM positivas e as que estavam no início da gestação tiveram realizada a avidéz de IgG. IgM neonatal foi obtida nos partos realizados na instituição. **Resultados:** A prevalência da infecção em 10.468 gestantes foi de 61,1% e 38,7% das gestantes eram suscetíveis. Entre as 272 gestantes IgG e IgM positivas, 87 retornaram para nova coleta e em 84 os níveis de anticorpos permaneceram inalterados. De nove gestantes com avidéz, houve apenas uma gestante com avidéz baixa e a IgM neonatal do recém-nascido foi positiva. Em 44 recém-nascidos na instituição, a IgM neonatal foi positiva em quatro. **Conclusões:** Encontrou-se alta prevalência da infecção em gestantes e de toxoplasmose congênita, mesmo sem dados sobre soroconversão. A maioria das sorologias IgM positivas foi relacionada à infecção passada. A relação custo-benefício do pré-natal em amostras isoladas pode ser otimizada com a análise do risco de transmissão materno-fetal nas gestantes IgM positivas. Quando houver risco, deve-se solicitar IgM ao recém-nascido e acompanhá-lo durante o primeiro ano de vida.

Palavras-chave: toxoplasmose congênita, sorologia para toxoplasmose, avidéz de IgG, prevenção.

## Abstract

**Purpose:** To describe and analyze the results of conventional serology for toxoplasmosis in pregnant women during prenatal care at Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas in Porto Alegre. **Methods:** Specific IgG and IgM were performed using fluorometric tests, with IgM capture. A second sample within two to three weeks was requested from all IgM-positive pregnant women and IgG avidity was performed in IgM positive pregnant women at the beginning of pregnancy. Neonatal IgM was obtained when the delivery occurred at the institution. **Results:** The prevalence of infection in 10,468 pregnant women was 61.1% and 38.7% pregnant women were susceptible. Among the 272 IgG and IgM-positive pregnant women, 87 returned for a second test and in 84 the antibody levels remained unchanged. Of nine pregnant women with avidity, there was only one low avidity and her newborn was IgM-positive. In 44 newborns at the institution, the neonatal IgM was positive in four. **Conclusions:** A high prevalence of pregnant women infection and congenital toxoplasmosis was found, even without data on seroconversion. Most of the IgM-positive serologies were related to past infection. The cost-benefit ratio of prenatal care in isolated samples may be optimized analyzing the risk of mother-to-child transmission in IgM-positive pregnant women. When there is a risk, a neonatal IgM must be requested and the newborn should be followed during the first year of life.

**Keywords:** congenital toxoplasmosis, serology for toxoplasmosis, IgG avidity, prevention.

## **Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes de um hospital público de Porto Alegre. Serologic profile of toxoplasmosis in pregnant women from a public hospital in Porto Alegre.**

### Introdução

A transmissão placentária foi a primeira forma conhecida de transmissão do *Toxoplasma gondii*. O feto é infectado usualmente por taquizoítas que cruzam a placenta a partir da circulação materna durante a infecção primária, mas cistos teciduais dormentes de infecção passada podem reiniciar o ciclo de vida do parasita em gestantes imunodeprimidas e, em casos raros, em gestantes imunocompetentes. A reinfecção tem sido observada mais recentemente.

O risco de transmissão materno-fetal e de gravidade das seqüelas estão relacionados com a idade gestacional em que a soroconversão materna ocorre. Dunn e colaboradores<sup>1</sup> analisaram 554 gestantes com soroconversão durante a gestação e estabeleceram que o risco de transmissão para aconselhamento clínico é de 29% durante a gestação: 2% nas oito primeiras semanas, 6% até 13 semanas, 72% até 36 semanas e 81% quando a infecção primária ocorre após a 36ª semana de gestação.

As crianças podem ser severamente comprometidas ou assintomáticas ao nascer. O risco estimado de desenvolvimento de hidrocefalia, coriorretinite e calcificação intracraniana isolada é de 61% (95%IC 34%; 85%) em 13 semanas, 25% (18 a 33%) em 26 semanas e 9% (4-17%) em 36 semanas. O prognóstico é mais favorável quanto mais tardiamente ocorre a infecção primária; mesmo assim, o risco de algum comprometimento clínico é de 6% com mais de 36 semanas de gestação. Após a detecção de infecção materna, o risco máximo de sinais clínicos precoces é de cerca de 10% entre 24 e 30 semanas. Muitos recém-nascidos assintomáticos apresentarão lesões oculares ou de sistema nervoso central que podem ser evitadas ou minimizadas com tratamento precoce<sup>1</sup>.

A prevenção da toxoplasmose congênita e das seqüelas pode ser obtida através de uma ou de combinações das seguintes estratégias: (a) educação das gestantes não-imunes ou suscetíveis sobre comportamentos preventivos<sup>2</sup>, (b) tratamento das gestantes com infecção aguda<sup>3</sup>, (c) tratamento dos fetos infectados<sup>4</sup>, (d) tratamento precoce dos recém-nascidos infectados, mesmo que assintomáticos<sup>5</sup>. A escolha de qualquer programa de triagem requer um estudo da doença, testes dos procedimentos, tratamento e suporte administrativo, de forma que uma relação dano-benefício possa ser estabelecida. Apesar do número considerável de publicações, a estratégia mais adequada para prevenir toxoplasmose congênita em determinada população depende de inúmeros fatores e é difícil de definir.

A triagem pré-natal foi introduzida em alguns países como a Áustria, a França, a Noruega e a Bélgica, com acompanhamento sorológico das gestantes suscetíveis e tratamento em caso de soroconversão. É cara e os testes para confirmar infecção fetal são invasivos. Seus defensores relatam, no entanto, baixa incidência de doença severa na criança quando a mãe é diagnosticada e tratada no pré-natal<sup>5</sup>. Mesmo com o uso de métodos sofisticados, alguns casos de toxoplasmose congênita não são diagnosticados precocemente, o que reforça a necessidade do seguimento cuidadoso dos recém-nascidos de risco<sup>6</sup>. Além disso, em 1999, foram publicados os resultados de uma revisão sistemática sobre a evidência de eficácia no tratamento da gestante. A revisão não conseguiu esclarecer se o tratamento pré-natal reduz a transmissão congênita do parasita<sup>7</sup>.

A triagem neonatal é considerada uma alternativa prática e de baixo custo quando a incidência de infecção primária na gestante é baixa<sup>8, 9</sup>. Foi adotada na Dinamarca e em outros países com o objetivo de identificar os recém-nascidos infectados e tratá-los precocemente. Na Dinamarca, a presença de IgM neonatal por captura identificou 70-80% dos casos de infecção

congênita<sup>9</sup>. Em estudos recentes, as duas abordagens, triagem pré-natal e neonatal, têm sido comparadas, na tentativa de buscar uma relação custo-efetiva em regiões com alta prevalência da infecção<sup>10,11</sup>.

Em Porto Alegre, alguns estudos já mostraram que a prevalência da infecção na gestante é elevada<sup>12,13</sup>. Varella e colaboradores encontraram uma prevalência na gestante do Hospital Nossa Senhora da Conceição de Porto Alegre de 59,8% (95%IC: 57,0%; 62,5%) que aumenta com a idade materna e diminui com a escolaridade. Os autores justificam a adoção de medidas preventivas primárias e secundárias até que novas evidências permitam maior racionalização no emprego de técnicas diagnósticas e terapêuticas<sup>13</sup>.

O Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, hospital de ensino do Ministério da Saúde, com residência médica nas áreas de Ginecologia/ Obstetrícia e Pediatria/ Neonatologia, já realizava a sorologia para toxoplasmose e a avidéz de IgG quando, em 2.000, passou a ser administrado pela Secretaria Municipal da Saúde. A rede municipal havia optado pela triagem pré-natal como estratégia de prevenção da toxoplasmose congênita, mas não havia definido as condutas subseqüentes, nem os serviços de referência para o encaminhamento das gestantes.

O objetivo deste estudo foi descrever e analisar os resultados da sorologia convencional para toxoplasmose em gestantes acompanhadas pelo pré-natal do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas em Porto Alegre.

## Pacientes e Métodos

O método de investigação empregado foi uma coorte prospectiva e descritiva. Entre 1998 e 2003, todas as gestantes encaminhadas pelo pré-natal do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas tiveram os testes sorológicos para toxoplasmose realizados por solicitação do obstetra, habitualmente na primeira consulta, tendo como critério de exclusão uma sorologia prévia compatível com infecção passada (IgG positiva e IgM negativa). A partir de 2000, a avidéz de IgG foi pesquisada nas gestantes IgM positivas que estavam no primeiro trimestre da gestação. Foi obtida a sorologia dos recém-nascidos nos partos realizados no hospital.

Os testes fluorométricos para IgG, IgM e avidéz de IgG foram realizados segundo as instruções dos fabricantes. A pesquisa de IgG anti-*T. gondii* foi processada pela técnica comercial MEIA, AxSYM<sup>®</sup> System Toxo IgG (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA) e os resultados foram expressos em UI/ml: negativo (inferior a 2,0), positivo (superior a 3,0), inconclusivo (entre 2,0 e 3,0). Níveis muito elevados de IgG pelo MEIA foram liberados como superiores a 300 UI/ml. A pesquisa de IgM anti-*T. gondii* foi processada pela técnica comercial ELFA, VIDAS TOXO IgM, (bioMérieux sa, Lyon, France) e os resultados foram expressos em índices: negativo (inferior a 0,55), positivo (superior a 0,65), inconclusivo (entre 0,55 e 0,65). As amostras IgM positivas foram armazenadas entre 2 e 8 °C por até cinco dias para a pesquisa da avidéz de IgG. A avidéz foi também realizada pelo ELFA, VIDAS System, mesmo sem solicitação médica, nas gestantes IgG e IgM positivas no primeiro trimestre, a partir de 2000. Os resultados foram expressos em índices: baixo (inferior a 0,2), alto (superior a 0,3), inconclusivo (entre 0,2 e 0,3).

Nova amostra em duas semanas foi solicitada no laudo de resultado a todas as sorologias IgG negativas e IgM positivas ou inconclusivas, acompanhadas da observação: “Nova amostra deve ser coletada em duas semanas para fazer a distinção entre infecção aguda e IgM falso-positiva”. Nova amostra também foi solicitada a todas as sorologias IgG e IgM positivas com índice de IgM inferior a 3,0, com a observação: “Sugere-se nova coleta em duas semanas para

diagnóstico de infecção aguda”. As sorologias dos recém-nascidos foram processadas durante a primeira semana de vida com as mesmas técnicas.

Os registros das informações foram feitos pelos próprios autores. A análise foi baseada na distribuição binomial, através do cálculo de uma proporção simples para estimar a prevalência de soropositividade e suscetibilidade à infecção pelo *T. gondii*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas. Como não seria possível identificar as pacientes na forma em que os dados seriam apresentados, não foi necessário o consentimento informado.

## Resultados

A sorologia para toxoplasmose foi realizada em 10.468 gestantes (Figura 1). As gestantes foram classificadas em quatro grupos em relação aos resultados: grupo I (IgG positiva, IgM negativa): 6.125 gestantes, 58,5% [95%IC: 57,26%; 59,74%]; grupo II (IgG positiva, IgM positiva ou inconclusiva): 272 gestantes, 2,6% [IC95%: 0,52%; 4,68%]; grupo III (IgG e IgM negativas): 4 052 gestantes, 38,7% [IC95%: 37,19% ; 40,21%] e grupo IV (IgG negativa, IgM positiva ou inconclusiva): 19 gestantes, 0,18% [IC95%: 0%; 4,72%].

Quarenta e quatro gestantes tiveram o parto realizado na instituição. Em quatro recém-nascidos assintomáticos no período neonatal a IgM foi positiva. (Tabela 1). Uma parturiente sem sorologia prévia para toxoplasmose teve um natimorto e a investigação de infecções congênitas evidenciou sorologia para toxoplasmose compatível com infecção aguda, IgG: 2.000 UI/ml; IgM: 1,9; avidéz: 0,07. A necrópsia da criança não foi realizada.

Das 272 gestantes IgG positiva e IgM positiva ou inconclusiva com solicitação de retorno em duas semanas, 87 (32%) retornaram para a segunda coleta. Destas, 54 tinham traços e 33 índices baixos de IgM. Duas gestantes com índices baixos de IgM (G1 e G3) apresentaram aumento dos níveis de anticorpos específicos compatível com infecção aguda. Em G1 observou-se a soroconversão de IgG pelo ELFA, cujo resultado na primeira amostra foi de 0 UI/ml. A IgM dos dois recém-nascidos foi positiva. Outra gestante com índice baixo de IgM apresentou queda dos níveis de anticorpos específicos (G2) e avidéz baixa na segunda amostra e a IgM do recém-nascido foi também positiva. Nas demais gestantes com segunda amostra, os níveis de anticorpos permaneceram inalterados. Uma gestante com traços de IgM (G4) teve um recém-nascido IgM positivo.

A IgG foi negativa e a IgM inconclusiva em sete gestantes e a IgG foi negativa e a IgM positiva em 12 gestantes. Quatro gestantes retornaram para a segunda coleta como havia sido sugerido e os níveis de anticorpos permaneceram inalterados.

A pesquisa de avidéz foi realizada em nove gestantes que estavam no início da gestação. O índice de avidéz foi baixo em G2 e alto nas demais. A IgM de todos os recém-nascidos foi negativa, exceto a IgM do recém-nascido de G2.

## Discussão

A maioria das gestantes nesta série fez a soroconversão no passado, portanto, o primeiro grupo foi constituído por gestantes imunes. O risco de transmissão materno-fetal do parasita neste grupo é desprezível, mas pode ocorrer infecção congênita se a gestante imunocompetente infectar-se com cepa de maior virulência. Pode ocorrer, também, por reativação de infecção crônica em gestantes HIV positivas com contagens baixas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou em gestantes imunossupressas. Justifica-se, portanto, a extensão da prevenção primária a todas as gestantes, independentemente da suscetibilidade.

No segundo grupo foram incluídas todas as gestantes IgM e IgG positivas, independentemente dos níveis de IgG e dos índices de IgM. O risco de transmissão materno-fetal do parasita precisa ser considerado, pois a IgM pode estar associada à infecção recém-adquirida, especialmente se a gestante é jovem e a prevalência da infecção na população é elevada.

As gestantes suscetíveis do terceiro grupo, sem imunidade ao parasita e em risco de fazer soroconversão durante a gestação, não foram acompanhadas sistematicamente com sorologias seqüenciais, nem seus recém-nascidos com IgM neonatal.

O quarto grupo reúne gestantes com IgM positiva ou inconclusiva e IgG negativa, em que apenas a segunda coleta após duas a três semanas pode definir se a infecção é recém-adquirida (soroconversão de IgG) ou se a IgM é falso-positiva.

Como as gestantes suscetíveis não foram acompanhadas com sorologias seqüenciais até o parto, a incidência de infecção aguda na gestante e de infecção congênita não pode ser estimada. As gestantes suscetíveis deveriam receber uma atenção especial, com prevenção primária rigorosa e controles subseqüentes da sorologia. Não houve, também, acompanhamento sorológico até o final do primeiro ano de vida dos recém-nascidos cujas sorologias maternas eram sugestivas de risco para o feto. No entanto, os dados obtidos permitem algumas considerações que podem ser úteis para reavaliar a estratégia de prevenção da toxoplasmose congênita na rede municipal em

relação a custo-benefício.

O período de incubação nos casos clínicos relatados de toxoplasmose aguda varia de 4 a 21 dias. Os níveis de IgG aumentam rapidamente pós-infecção, alcançam os valores mais elevados em um a dois meses, seguindo-se um longo declínio ao longo dos anos, que segue padrões individuais. A IgG específica usualmente persiste por toda a vida<sup>14</sup>. Algumas vezes é difícil estabelecer o estado imune quando os níveis de IgG estão próximos ao ponto de corte. O MEIA detecta valores muito baixos de IgG, um dos mais baixos entre os *kits* comerciais<sup>15</sup>, razão de ter sido o método escolhido. Além disso, o Sistema AxSYM®, Abbott, permite rapidez na liberação dos resultados.

A IgM específica é, usualmente, a primeira a ser detectada, já na primeira semana pós-infecção. Sua persistência por mais de seis meses com testes de grande sensibilidade como o utilizado, é responsável pela pobre especificidade observada no diagnóstico de infecção aguda, de extrema relevância na gestante. Assim, um resultado isolado positivo não tem valor absoluto, a IgM pode ser “residual” ou falso-positiva. Os índices relacionados à infecção aguda são, no entanto, significativamente mais elevados do que os residuais<sup>16</sup>.

Os índices de IgM são fundamentais para a correta interpretação da sorologia na gestante. Em estudos com o ELFA foram observados índices superiores a 3,0 em 30 indivíduos com infecção aguda e em 29, os índices foram superiores a 3,5. Em 20 indivíduos na “fase de transição”, em que os níveis de IgG estão bastante elevados e a IgM está ausente ou presente em níveis baixos, somente sete mostraram índices entre 3,0 e 3,5, enquanto os índices dos indivíduos com infecção latente foram inferiores a 3,0. Durante infecção aguda índices crescentes de IgM também podem ser encontrados<sup>16</sup>.

De 87 gestantes IgG e IgM positivas com amostras sequenciais, G1 e G3 mostraram níveis crescentes e G2, níveis decrescentes de IgG e IgM, sendo os três recém-nascidos IgM positivos. G2 estava na 15<sup>a</sup> semana de gestação quando níveis elevados de IgG e IgM de 2,4

foram detectados na primeira sorologia. A avidéz foi introduzida na instituição no intervalo entre as duas coletas. A segunda coleta após quatro semanas mostrou queda dos níveis dos anticorpos e avidéz baixa (0,13). A informação de infecção recém-adquirida poderia ter sido obtida já na primeira amostra, se a pesquisa de avidéz tivesse sido realizada. Níveis inalterados de anticorpos foram observados nas demais gestantes, sendo a IgM considerada residual, provavelmente relacionada à infecção adquirida há mais de seis meses ou falso-positiva.

A segunda amostra foi essencial em quatro de 19 gestantes IgG negativas/ IgM positivas ou inconclusivas, que retornaram para a segunda coleta. Os resultados inalterados das segundas amostras permitiram interpretar as IgM como falso-positivas.

Avidéz alta tem sido utilizada para excluir infecção recém-adquirida pós-concepção em amostras obtidas no primeiro trimestre da gestação ou nas 20 semanas anteriores à coleta da amostra<sup>17,18</sup>. Das nove gestantes no início da gestação, oito tiveram avidéz alta e uma avidéz baixa, sendo apenas infectado o recém-nascido da gestante com avidéz baixa.

Uma das gestantes em que o recém-nascido foi infectado (G4) tem uma única amostra coletada na 24<sup>a</sup> semana com IgG elevada e traços de IgM, em que a pesquisa de avidéz poderia ter sugerido risco de transmissão materno-fetal.

Testes sorológicos diferentes detectam, com freqüência, anticorpos diferentes, com padrões próprios de elevação e queda pós-infecção<sup>14</sup>. Quando se dispõe de amostra isolada ou solicitada tardiamente na gestação, os índices de IgM precisam ser vinculados aos níveis de IgG para que a interpretação da sorologia considere tanto a dinâmica da formação de anticorpos quanto o espaço de poucos meses entre concepção e parto. É preciso considerar que resultados discordantes gerados por diferentes serviços afligem obstetras, pacientes e geram procedimentos invasivos e testes caros como o PCR, na maioria das vezes, desnecessários<sup>14, 19</sup>.

A análise do desempenho de diferentes estratégias sorológicas (20 métodos e 195

combinações) no diagnóstico da infecção aguda pelo toxoplasma em relação a sensibilidade e especificidade clínicas, mobilizou 29 centros de referência europeus. Excelente desempenho, sensibilidade igual ou superior a 95% e especificidade próxima a 99%, foi obtido pelo uso seqüencial de IgM (alta sensibilidade) e de um método que explora a qualidade da IgG (aglutinação diferencial ou avidéz). Os autores referem que tal poder diagnóstico não tem precedentes, especialmente na prevenção da toxoplasmose congênita<sup>20</sup>.

Em nossa série, apenas 32% das gestantes com retorno solicitado para esclarecer o perfil imunológico atenderam à solicitação. Das 4.343 gestantes de risco (grupos II, III e IV), somente 44 (1,0 %) tiveram o parto realizado na instituição. As tentativas para obter informações sobre os resultados das IgM neonatais em outros hospitais foram frustradas pela falta de registros, mesmo em centros que, por serem de ensino, são considerados de referência. Este é um dos maiores problemas que se enfrenta na análise do desempenho dos testes sorológicos e das políticas de saúde pública.

Quatro crianças IgM positivas em 44 sorologias maternas de risco é um percentual elevado que permite uma estimativa grosseira sobre a prevalência da toxoplasmose congênita no Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas: alta e próxima à encontrada por Lago e colaboradores, também em Porto Alegre, de 6/10.000 [95% IC 1,3/10.000; 10,7/10.000]<sup>11</sup>.

Dois trabalhos recentes chamam a atenção para outro aspecto: as diferenças quanto à prevalência entre grupos socioeconômicos distintos. O estudo comparativo da toxoplasmose congênita entre hospitais públicos e privados em Uberlândia, Minas Gerais, mostrou diferenças significativas, 57,65 e 41,9% respectivamente, quanto à frequência de toxoplasmose congênita, 0,8% e 0%, respectivamente, em 500 amostras de sangue de cordão umbilical provenientes de hospitais públicos e 305 amostras provenientes de hospitais privados. Os autores enfatizam a

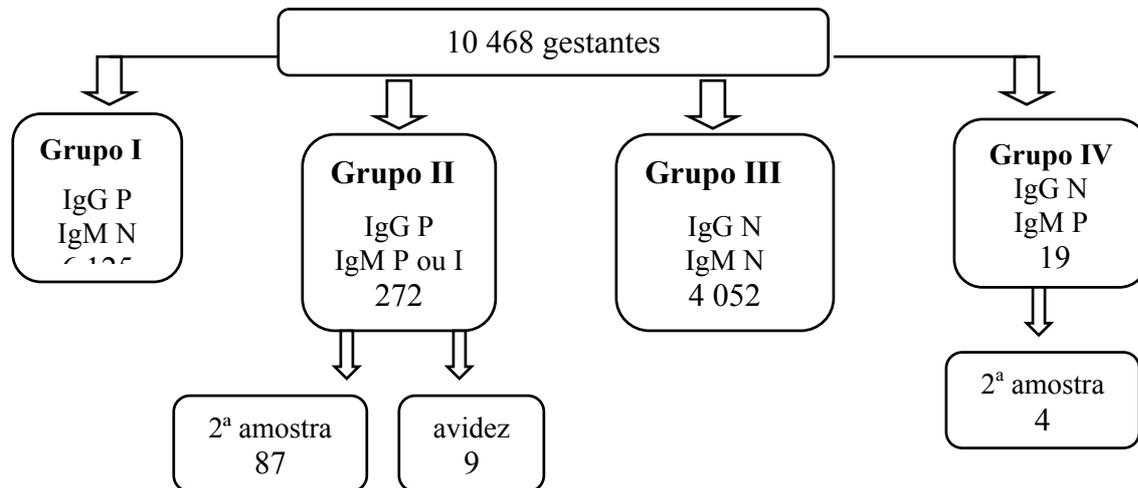
importância de programas de triagem na gestante, especialmente em hospitais públicos, devido à taxa elevada de toxoplasmose congênita nestes centros<sup>21</sup>. Em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, a incidência de toxoplasmose congênita foi de 8/10.000 e a distribuição quanto ao *status* socioeconômico revelou que 84,5% das gestantes situavam-se em C, D e E<sup>22</sup>.

Em conclusão, encontrou-se uma prevalência elevada de toxoplasmose nas gestantes analisadas, bem como de toxoplasmose congênita, mesmo sem dados sobre soroconversão. Apenas um terço das gestantes com suspeita de infecção recente retornou para repetir a sorologia. A maioria das sorologias IgM positivas foi relacionada à infecção passada. Em regiões com alta prevalência da infecção, a relação custo-benefício da sorologia pré-natal em amostra isolada pode ser otimizada se as amostras IgM positivas forem avaliadas quanto aos níveis dos anticorpos específicos e aos resultados da avidéz em relação à idade gestacional, para definir risco de transmissão materno-fetal. Sempre que a sorologia materna indicar risco, deve-se solicitar IgM ao recém-nascido e acompanhá-lo durante o primeiro ano de vida. É necessária a integração entre os diversos níveis de atendimento do sistema público de saúde para que se possa atingir a máxima eficiência no controle da toxoplasmose gestacional e congênita.

## Agradecimentos

Agradecemos a Dra Eleonor Gastal Lago pela revisão cuidadosa do manuscrito e pelas sugestões preciosas.

**Figura 1-** Resultados da sorologia anti-*Toxoplasma gondii* realizadas entre 1998 e 2003 nas gestantes do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas.



N= negativa, I= inconclusiva, P= positiva.

**Tabela 1-** Dados das sorologias maternas nos casos de recém-nascidos positivos.

<b>Identificação</b>	<b>intervalo</b>	<b>IG</b>	<b>IgG UI/ml</b>	<b>IgM*</b>	<b>avidez</b>	<b>RN-IgM</b>
	<b>semanas</b>	<b>semanas</b>	<b>MEIA</b>	<b>índice</b>	<b>índice</b>	<b>índice</b>
<b>1- 1ª amostra</b>	6	30	17	2,9	ni	5,5
2ª			>300	4,2		
<b>2- 1ª amostra</b>		15	>300	2,4	ni	1,4
2ª	4		199	2,0	0,13	
3ª	20	parto	69	1,4		
<b>3- 1ª amostra</b>	4	28	165	1,8	ni	2,7
2ª			>300	8,7		
<b>4- uma amostra</b>		24	>300	0,8	ni	1,3

**Obs:** G 1= 1ª gestante, G 2= 2ª gestante, G 3= 3ª gestante, G 4ª = quarta gestante; IG= idade gestacional; RN= recém-nascido; ni= não introduzida

\*Sorologias maternas em ordem decrescente por índice de IgM na primeira amostra.

## Referências

- 1- Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counseling. *Lancet* 1999; 353: 1829-33.
- 2- CDC 2000. Preventing Congenital Toxoplasmosis. *MMWR* 2000; 49 (RR02); 57-75.
- 3- Bessières MH, Berrebi A, Rolland M, Bloom MC, Roques C, Cassaing S et al. Neonatal screening for toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur J Obst & Gynecol and Reprod Biol* 2001; 94: 37-45.
- 4- Forestier F, Hohlfeld P, Sole Y, Daffos F. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by PCR: extended experience. *Prenat Diagn* 1998; 18 (4): 407-9.
- 5- Lynfield R, Hsu H-W, Guerina NG. Screening methods for toxoplasma and risk of disease. *Lancet* 1999; 353: 1899-1900.
- 6- Robert-Gangneux F, Gavinet M-F, Ancelle T, Raymond J, Tourte-Schaeffer C, Dupouy-Camet J. Value of Prenatal Diagnosis and Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Retrospective Study of 110 Cases. *J Clin Microbiol* 1999; 37(9): 2893-98.
- 7- Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ* 1999; 318: 1511-14.
- 8- Evengård B, Petersson K, Engman M-L et al. Low incidence of *Toxoplasma* infection during pregnancy and in newborns in Sweden. *Epidemiol Infect* 2001; 127: 121-7.
- 9- Lebech M, Andersen O, Christensen NC, Hertel J, Nielsen HE, Peitersen B et al and the Danish Congenital Toxoplasmosis Study Group-Feasibility of neonatal screening for toxoplasmosis infection in the absence of prenatal treatment. *Lancet* 1999; 353:1834-37.

- 10- Ricci M, Pentimalli H, Thaller R, Ravà L, Di Ciommo V. Screening and prevention of congenital toxoplasmosis: an effectiveness study in a population with a high infection rate. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; 14 (6): 398-403.
- 11- Lago EG, Neto EC, Melamed J, Rucksi AP, Presotto C, Coelho JC et al. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in Porto Alegre, RS, Brazil. In: *Proceedings of the International Conference on Toxoplasmosis; 2003, Copenhagen*. Copenhagen: The Panum Institute, University of Copenhagen, 2003. p. 40.
- 12- Petry LC, Tessaro MM, Guedes CR e Reis MM. Análise dos Resultados da Sorologia para Toxoplasmose em Gestantes do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas (HMIPV) em Porto Alegre, RS, utilizando a Pesquisa de Anticorpos Específicos pelo ELFA, Sistema VIDAS®, bioMérieux. *NewsLab* 2000; 42: 114-120.
- 13- Varella IS, Wagner MB, Darela AC, Nunes LM, Müller RW. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. *J Pediatr* 2003;79 (1): 69-74.
- 14- Montoya JC. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2002; 185 (Suppl 1): 72-82.
- 15- Cimon B, Marty P, Morin O, Bessières M-H, Marx-Chemla C, Gay-Andrieu F et al. Specificity of Low Anti-*Toxoplasma* IgG Titers with IMx and AxSYM Toxo IgG Assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32: 65-7.
- 16- Camargo ME. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editores. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p. 278-88.

- 17- Jenun PA, Stray-Pedersen B, Gundersen A-G. Improved Diagnosis of Primary *Toxoplasma gondii* Infection in Early Pregnancy by Determination of Antitoxoplasma Immunoglobulin G Avidity. J Clin Microbiol 1997; 35(8): 1972-7.
- 18- Lappalainen M, Koskela P, Koskiniemi M, Ämmälä P, Hiilesmaa V, Teramo K et al. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. J Infect Dis 1993; 167: 691-697.
- 19- Ferreira AW & Camargo ME. Toxoplasmosis and the laboratory: diagnosis and a constant striving for improvement (editorial). Rev Inst Med Trop São Paulo 2002; 44 (3):119-20.
- 20- Roberts A, Hedman K, Luyasu V, Zufferey J, Bessières M-H, Blatz R-M et al. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. Europ J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 467-474.
- 21- Segundo GRS, Silva DAO, Mineo JR, Ferreira MS. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99 (1): 13-7.
- 22- Mozzatto L, Procianoy RS. Incidência de toxoplasmose congênita no sul do Brasil: estudo prospectivo. Rev Inst Med Trop São Paulo 2003; 45 (3): 147-51.

## ANEXO B

### **IgM E AVIDEZ DE IgG ANTI-TOXOPLASMA EM AMOSTRAS ISOLADAS DE ÁREAS COM ALTA PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PODEM DETERMINAR O RISCO DE TRANSMISSÃO MATERNO-FETAL**

Myrian Morussi REIS (1,2,3),

Maria Madalena TESSARO (1) &

Pedro Alves D'AZEVEDO (2)

(1) Setor de Imunologia do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, Porto Alegre, RS, Brasil.

(2) Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

(3) Programa de Pós-Graduação em Patologia Clínica da Fundação Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondência para Myrian Morussi Reis

Rua Hilário Ribeiro, nº 15, apartamento 202, bairro Moinhos de Vento, 90 510-040, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

## RESUMO

A avidéz de IgG anti-*Toxoplasma* foi realizada em 168 amostras IgG e IgM positivas de gestantes, coletadas em qualquer período da gestação, para avaliar o valor preditivo do risco de transmissão materno-fetal em amostra única, considerando as limitações da sorologia convencional. A IgM neonatal foi considerada o marcador sorológico de transmissão. Testes fluorométricos foram realizados para IgG, IgM (imunocaptura) e avidéz de IgG. Cinquenta e uma das 128 gestantes testadas tiveram os partos realizados na instituição e a IgM neonatal foi obtida. Os resultados mostraram 32 (62.75%) gestantes com avidéz alta, índices de IgM entre 0,6 e 2,4 e nenhum recém-nascido infectado. Dezenove (37.25%) tiveram avidéz baixa ou inconclusiva, índices de IgM entre 0,6 e 11,9, cinco recém-nascidos infectados e um natimorto. Em dois recém-nascidos infectados e no natimorto, os índices maternos de IgM foram baixos e em um recém-nascido infectado, o único parâmetro materno que sugeriu risco para o feto foi a avidéz de IgG. No presente estudo, a avidéz de IgG realizada em amostras isoladas de gestantes IgM positivas auxiliou a determinar o risco de transmissão durante toda a gestação, especialmente quando os índices dos dois testes foram analisados em relação à idade gestacional. Este modelo pode ser menos oneroso para países em desenvolvimento com alta prevalência da infecção e cria uma nova perspectiva para o diagnóstico da toxoplasmose congênita.

Palavras-chave: toxoplasmose congênita - sorologia para toxoplasmose - avidéz de IgG

## INTRODUÇÃO

O risco de transmissão materno-fetal do *Toxoplasma gondii* e a severidade das seqüelas na infecção congênita têm sido correlacionados com a idade gestacional em que a soroconversão ocorre<sup>4</sup>. Redução significativa na freqüência e na severidade da doença no período neonatal tem sido associada com tratamento intra-útero dos fetos infectados<sup>1,16</sup>, mesmo que o tratamento não previna a transmissão do parasita<sup>24</sup>. A alta prevalência da infecção pelo *Toxoplasma* em gestantes de Porto Alegre levou à implantação da triagem sorológica no pré-natal da rede municipal<sup>12</sup>.

Anticorpos da classe IgM podem aparecer mais cedo e seus níveis podem cair mais rápido do que os níveis de anticorpos da classe IgG e são freqüentemente a primeira classe de anticorpos detectada após infecção primária<sup>17</sup>. Apesar da ampla distribuição de kits comerciais para medir IgM, estes não são padronizados; portanto, resultados quantitativos de diferentes fabricantes não são comparáveis. Diversos métodos para a detecção de IgM ainda têm uma alta freqüência de falsos positivos e em alguns pacientes, a IgM positiva é "residual", detectada durante a fase crônica da infecção. Um resultado positivo de IgM em amostra isolada pode ser interpretado como positivo verdadeiro em infecção aguda, positivo verdadeiro em infecção crônica ou como falso positivo<sup>17</sup>.

Os índices de IgM relacionados à infecção aguda são significativamente mais elevados do que os residuais<sup>25</sup>. Com o ELFA- enzyme-linked fluorescent assay, sistema VIDAS, o aumento dos índices de IgM ou índices superiores a 3,5 foram observados em infecção aguda, índices entre 3,0 e 3,5 na fase de transição e índices entre 0,65 e 3,0 em infecção latente<sup>2</sup>.

A IgM deve ser processada por testes com reações inespecíficas mínimas como o EIA de captura<sup>2,5,25</sup>. O algoritmo para o sorodiagnóstico da toxoplasmose nos USA determina a pesquisa de IgM quando o tempo de infecção necessita ser definido. Se a IgM é positiva em índices elevados, a infecção provavelmente ocorreu nos últimos três a seis meses. Se é

positiva em baixos índices pode ser falso-positiva, pode ser relacionada à infecção adquirida nos últimos dois anos ou estar relacionada à reinfeção. Se é negativa, a infecção ocorreu há mais de dois anos. Os autores sugerem que indivíduos com índices baixos de IgM colem uma segunda amostra, processando ambas em paralelo para detectar com segurança aumento dos níveis de anticorpos<sup>25</sup>. Na gestante com índices baixos de IgM, é difícil determinar o tempo de infecção e excluir a possibilidade de transmissão.

Em 1989, Hedman e col.<sup>9</sup> introduziram a avidéz de IgG para auxiliar no diagnóstico da infecção aguda baseada na força de ligação da IgG específica a um antígeno multivalente do parasita, que é baixa após infecção primária e aumenta ao longo do tempo. Alta avidéz no início da gestação tem sido usada como parâmetro para excluir infecção pós-concepção.<sup>9,10</sup>

O risco de infecção aguda, parasitemia e transmissão materno-fetal tem sido associado com altos níveis de IgG<sup>14</sup>, presença de IgM<sup>14</sup> ou altos índices de IgM<sup>2,14,25</sup> e baixa avidéz<sup>5,9,11,13,18,22,23</sup>. As respostas sorológicas, no entanto, seguem ritmos diversos, individuais.

Avidéz baixa, assim como a presença de IgM podem ser detectadas longo tempo após infecção primária em alguns indivíduos. IgG elevada e mesmo muito elevada nem sempre é observada em infecção aguda, especialmente nas primeiras semanas<sup>11</sup>.

No Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas em Porto Alegre, a sorologia para toxoplasmose é solicitada na primeira visita ao pré-natal, mas o acompanhamento das gestantes suscetíveis é realizado pobremente ou não é realizado. Amostras de gestantes IgG e IgM positivas que iniciaram o acompanhamento pré-natal tarde ou foram apenas testadas no momento do parto, ocorrem com frequência. Deve-se tentar definir o estado imunológico da paciente a partir de amostras isoladas, tendo em mente que ultrassonografia, amniocentese e PCR (polymerase chain reaction) são solicitados a partir da sorologia.

O objetivo deste estudo foi, portanto, avaliar a avidéz de IgG em amostras de gestantes IgG and IgM positivas em relação à capacidade de identificar risco de transmissão materno-fetal do *Toxoplasma* em amostras isoladas, solicitadas em qualquer idade gestacional, considerando as limitações da sorologia convencional. Os níveis de IgG e os índices IgM e de avidéz de IgG foram analisados e a IgM neonatal foi usada como marcador sorológico de transmissão materno-fetal.

## PACIENTES E MÉTODOS

A avidéz de IgG anti-*T. gondii* foi prospectivamente determinada em todas as amostras IgG e IgM positivas obtidas de gestantes em sua primeira visita ao Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, entre 2000 e 2004, independente da idade gestacional. Cinquenta e uma gestantes tiveram o parto realizado no hospital. Amostras séricas dos recém-nascidos foram obtidas para determinar a IgM neonatal.

IgG anti-*T. gondii* foi medida pela técnica comercial MEIA, AxSYM<sup>®</sup> System Toxo IgG (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). Os resultados foram expressos em Unidades Internacionais por mililitro (UI/ml), negativo: <2,0, positivo: >3,0, inconclusivo: entre 2,0 e 3,0.

IgM anti-*T. gondii* foi medida pela técnica comercial ELFA, VIDAS Toxo IgM (bioMérieux sa, Lyon, France). Os resultados foram expressos em índices, negativo: <0,55, positivo: >0,65, inconclusivo: entre 0,55 e 0,65.

A avidéz de IgG foi também medida pela técnica comercial ELFA. Os resultados foram expressos em índices: baixo: < 0,2, alto: > 0,3, inconclusivo: entre 0,2 e 0,3.

As técnicas foram processadas como recomendam os fabricantes. As IgG e IgM específicas dos recém-nascidos foram processadas com as mesmas técnicas.

O Teste Exato de Fisher foi usado para analisar (a) a associação entre IgM categorizada e transmissão, (b) IgM categorizada e avidéz, (c) avidéz e transmissão. O Teste *t* Student foi usado para analisar a associação entre índice de avidéz e transmissão. A correlação de Pearson foi usada para analisar a correlação dos índices de IgM e de avidéz.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas.

## RESULTADOS

A avidéz de IgG foi realizada em 168 amostras de gestantes IgG e IgM positivas (cerca de 2.5% do total de sorologias realizadas durante este período) e foi alta em 128 (76%) e baixa ou inconclusiva em 40 (24%). A idade gestacional foi informada em 105 gestantes (62.5%) das quais 33 (31,4%) estavam no primeiro, 36 (34,3%) no segundo e 33 (31,4%) no terceiro trimestre da gestação. Cinquenta e uma gestantes (30%) tiveram o parto realizado no hospital, tornando possível obter a IgM neonatal.

Entre as 128 gestantes com avidéz alta, 32 tiveram o parto realizado na instituição. Os níveis de IgG variaram de 58 a 8.832 UI/ml e os índices de IgM variaram de 0,65 a 2,4. Dezoito mães tiveram índices baixos de IgM (entre 1,0 e 3,0) e 14 mães somente traços de IgM (entre 0,65 e 0,9). Onze mães estavam no primeiro, sete no segundo e 14 no terceiro trimestre da gestação. A IgM neonatal foi negativa em todos os recém-nascidos.

Entre as 40 gestantes com avidéz baixa ou inconclusiva, 19 tiveram o parto realizado na instituição (Tabela 1). Os níveis de IgG variaram de 106 a 3.356 UI/ml e os índices de IgM variaram entre 0,65 e 11,9. Seis mães tiveram índices de IgM superiores a 3,5 e avidéz muito baixa (M1 a M6), 11 tiveram índices baixos de IgM (entre 1,0 e 3,0) e duas somente traços de IgM (entre 0,65 e 0,9). Duas mães estavam no primeiro, seis no segundo e 11 no terceiro trimestre da gestação.

Cinco recém-nascidos IgM positivos (M1, M2, M5, M11 and M13) e um natimorto (M12) resultaram destas mães. Em três recém-nascidos infectados (M1, M2 e M5), os índices maternos de IgM foram extremamente elevados e em dois recém-nascidos (M11 and M13) e no natimorto (M12), os índices de IgM foram baixos. As sorologias maternas de M2 e M5 foram muito semelhantes: baixos níveis de IgG e altos índices de IgM.

De acordo com o teste Exato de Fisher existe associação significativa entre IgM categorizada (índice maior do que 3,0) e transmissão ( $p < 0,028$ ), sendo a IgM neonatal o marcador sorológico de transmissão. IgM alta resulta em um número maior de crianças infectadas do que IgM baixa ou inconclusiva. Existe também uma associação significativa entre IgM categorizada e avidéz categorizada ( $p < 0,001$ ), IgM alta sendo associada com avidéz baixa e vice-versa. Existe também associação entre avidéz categorizada e transmissão ( $p < 0,001$ ), avidéz baixa associada com transmissão e avidéz alta associada com ausência de transmissão usando o índice de corte do fabricante de 0,2. Reduzindo-se o índice de corte para 0,15 aumenta a associação entre avidéz baixa e transmissão. De acordo com o teste *t* Student, há associação significativa entre índice de avidéz e transmissão ( $p > 0,001$ ), sendo um índice baixo de avidéz associado com uma chance maior de transmissão.

De acordo com a correlação de Pearson, existe correlação significativa entre os índices de IgM e avidéz, moderada e inversa, portanto a um índice alto de avidéz corresponde um índice baixo de IgM e vice-versa ( $r = - 0,548$ ,  $p < 0,001$ ). A relação entre os índices de IgM e de avidéz quando a avidéz é baixa pode ser observada na Figura 1 ( $r = - 0,472$ ;  $p = 0,041$ ) e quando é alta, na Figura 2 ( $r = - 0,275$ ;  $p = 0,128$ ).

## DISCUSSÃO

Quando a triagem sorológica para toxoplasmose é realizada na gestante, a primeira amostra sérica é usualmente obtida na primeira visita da gestante ao pré-natal após a confirmação da gestação, usualmente entre a oitava e a 12<sup>a</sup> semanas de gestação. No Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, a primeira amostra sérica da gestante é freqüentemente obtida após a 20<sup>a</sup> semana de gestação, ou mesmo, como parturiente. Se a simples presença de IgM em amostras isoladas é o parâmetro usado para identificar infecção aguda, muitas gestantes serão erroneamente identificadas como provavelmente ou possivelmente infectadas de acordo com o sistema de classificação do grupo de trabalho do European Research Network on Congenital Toxoplasmosis<sup>14</sup> e desnecessariamente submetidas à amniocentese e/ou tratamento anti-parasitário.

Por estas razões, amostras isoladas IgG e IgM positivas foram analisadas em relação aos três parâmetros, IgG em UI/ml por MEIA e ELFA e índices de IgM e avides de IgG por ELFA. Os parâmetros foram comparados à infecção fetal determinada pela IgM neonatal, a fim de medir o risco de transmissão materno-fetal. A ausência de IgM neonatal em 32 recém-nascidos de mães com alta avides, baixos índices de IgM e mesmo níveis muito altos de IgG reforça a importância da avides alta para excluir risco de transmissão.

A presença de IgM neonatal em cinco crianças cujas mães tinham avides baixa e um natimorto reforça a importância de avides baixa quanto ao risco de transmissão, quando medida em uma gestante IgM positiva. Altos índices de IgM (M1, M2 e M5) também salientam a importância dos índices de IgM quanto ao risco de transmissão. M3 e M4 tinham menos de 20 semanas e seus recém-nascidos foram IgM negativos, provavelmente porque o risco de transmissão é baixo na primeira metade da gestação.

A avidéz pelo VIDAS foi padronizada e otimizada para excluir soroconversão recente em gestantes com índices elevados de IgM anti-*Toxoplasma* no primeiro trimestre da gestação<sup>6</sup>. A associação entre avidéz categorizada e transmissão ( $p < 0,001$ ) usando o valor de corte do fabricante de 0,2 aumenta quando este valor é reduzido para 0,15, com seis casos de transmissão em 12 gestantes.

Sem avidéz, as crianças infectadas de M11 e M13 com baixos níveis de IgM poderiam não ter sido identificadas. Em um recém-nascido infectado (M13), o único parâmetro materno que sugeriu fortemente risco para o feto foi a avidéz. Estes são os resultados da sorologia convencional mais difíceis de correlacionar com transmissão, já que a IgM pode ser residual numa curva descendente.

A correlação moderada e inversa obtida entre os índices de IgM e de avidéz nas amostras com baixa avidéz (Figura 1) desta série ( $r = - 0.472$ ,  $p = 0.041$ ) é muito similar à correlação encontrada por Jenum e col. (1997) entre os índices de avidéz e o tempo estimado de infecção ( $r = 0.46$ ). A correlação obtida entre os índices de IgM e de avidéz nas amostras com avidéz alta (Figura 2) nesta série ( $r = - 0.275$ ,  $p = 0.128$ ) não é significativa, portanto avidéz alta não mostra qualquer relação com IgM. Houve melhor associação de transmissão com avidéz ( $p < 0.001$ ) do que com IgM categorizada, índice maior do que 3.0 ( $p < 0.028$ ).

A dinâmica na produção de anticorpos deve ser lembrada na interpretação dos resultados maternos, especialmente em amostras isoladas. Considerando as técnicas de triagem usadas no Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, a sensibilidade do MEIA-IgG<sup>3</sup> e o ensaio de captura do ELFA-IgM<sup>2</sup>, o risco de transmissão materno-fetal é relacionado ao tempo provável de aparecimento dos anticorpos: (1º) IgM > 3.0/ IgG < 20 UI/ml, (2º) IgM > 3.0/ IgG entre 20 e 300 UI/ml, (3º) IgM > 3.0/ IgG > 300 UI/ml, (4º) IgM < 3.0/ IgG positiva independente do nível. Estas são, portanto, as que mais se beneficiam dos resultados da

avidez: avidez baixa indicando um risco maior de infecção congênita, avidez alta um risco menor.

Alta avidez, acima de 20% na série de Jenum e col.<sup>11</sup> pode ser usada para excluir infecção aguda nas primeiras 20 semanas, o que reforça os achados de Lappalainen e col. que encontraram um valor preditivo de 100% para avidez alta nos cinco meses precedente<sup>13</sup>.

Na série de Flori e col.<sup>6</sup>, o aumento dos índices de avidez foi lento; o tempo médio para alcançar o limiar 0,3 foi de 14,2 meses. Nenhuma mulher atingiu este limiar nem aos quatro, nem aos seis meses após soroconversão. De acordo com os autores, é justificável diminuir o limiar para excluir uma infecção recente de menos de quatro meses para 0,2 e usar o limiar de 0,3 do fabricante para excluir infecções de mais de seis meses. A cinética do teste de avidez em cinco grupos de mulheres quanto ao tipo e duração do tratamento também foi avaliada e não houve diferenças significativas quando comparações foram feitas entre os grupos.

A melhor estratégia para prevenir e controlar a infecção congênita pelo *Toxoplasma* não é clara. Na França, um país com alta prevalência da infecção, a prevenção é realizada com a triagem sorológica e com o acompanhamento das gestantes suscetíveis até o parto com sorologias mensais<sup>1,16,21</sup>. Soroconversão indica infecção aguda materna. Detecção do parasita no líquido amniótico pode ser realizada por cultura, inoculação em camundongo e PCR para confirmar infecção fetal.

O PCR para a detecção do *T. gondii* revolucionou o diagnóstico pré-natal permitindo que o feto infectado tenha diagnóstico precoce e não seja submetido a procedimentos mais invasivos, graças a sua sensibilidade, especificidade e rapidez<sup>7,17</sup>. No entanto, os resultados de um estudo colaborativo europeu mostraram a falta de homogeneidade entre diferentes protocolos de PCR e seus desempenhos, e o que torna necessário um controle de qualidade

externo<sup>19</sup>. Há, também, marcadas diferenças quanto à sensibilidade relacionadas à idade gestacional no momento e que é realizada a amniocentese. PCR no líquido amniótico não é recomendado a mulheres HIV positivas, porque existe risco de transmissão do vírus ao feto durante o procedimento<sup>17</sup>.

Dunn e col.<sup>4</sup> analisaram o perfil de infecção congênita em 554 casos. A média de transmissão materno-fetal foi de 29%, que mascarou um aumento pronunciado no risco de 6% em 13 semanas para 72% em 36 semanas. Gestantes que fizeram a soroconversão entre 24 e 30 semanas tiveram o maior risco (10%) de ter uma criança infectada congenitamente com sinais clínicos precoces e em risco de complicações tardias.

A maioria das crianças infectadas não tem sinais da doença ao nascer, mas tem risco importante de desenvolver seqüelas tardias: coriorretinite em mais de 85% crianças infectadas e anormalidades neurológicas. Redução marcada na freqüência e na severidade da doença ao nascimento tem sido associada ao tratamento intra-útero. Redução significativa nas complicações tardias tem sido associada com extensão dos regimes de tratamento pós-natal iniciados no período neonatal ou como continuação dos regimes de tratamento intra-útero<sup>1,16, 21</sup>.

Apesar do uso de métodos mais avançados, alguns casos de toxoplasmose congênita não são detectados precocemente, o que salienta a importância do cuidadoso seguimento dos recém-nascidos em risco<sup>21</sup>. Na Dinamarca, um país com baixa prevalência da infecção, o programa de triagem neonatal baseado apenas na detecção de IgM específica a partir do cartão para PKU (fenilcetonúria) conseguiu identificar mais de 75% das crianças infectadas por gestantes que não foram tratadas<sup>15</sup>. Esta estratégia pode ser a mais apropriada para países com baixa prevalência da infecção<sup>8,15</sup>. Nos Estados Unidos, uma amostra isolada,

freqüentemente obtida tardiamente no primeiro trimestre ou durante o segundo ou terceiro trimestre é a única fonte de informação sobre o risco fetal<sup>26</sup>.

Ricci e col.<sup>20</sup> compararam os resultados das duas abordagens em uma população com alta prevalência da infecção, com o objetivo de avaliar a efetividade destas estratégias em 5.288 gestantes suscetíveis, 188 identificadas como infectadas, e 9.730 recém-nascidos. Neste estudo, a triagem neonatal pareceu ser menos sensível que a pré-natal. Em um estudo realizado em Porto Alegre, a triagem neonatal identificou casos de toxoplasmose congênita adquirida e transmitida no final da gestação, indetectados pela triagem pré-natal<sup>12</sup>.

A prevalência da toxoplasmose congênita é alta em Porto Alegre<sup>12</sup>. Programas de prevenção em amostras isoladas devem ser cuidadosamente avaliados. É necessário escolher as melhores combinações de testes<sup>11,22</sup>. Já que a avidéz tem sido largamente empregada como teste confirmatório, 117 casos de toxoplasmose na gestação divididos em categorias de risco de acordo com Lebech e col. foram reexaminados incluindo a avidéz, que foi capaz de definir 77 dos 117 casos (65,8%) com apenas uma amostra. A avidéz provou ser um método útil para classificar a infecção pelo *Toxoplasma* em uma única amostra, especialmente na gestação<sup>13</sup>.

Um estudo multicêntrico europeu<sup>22</sup> analisou 20 testes que detectam anticorpos anti-*T. gondii* após infecção primária e suas combinações. Os critérios de seleção das amostras permitiram avaliar o desempenho dos testes em termos de sensibilidade e especificidade clínica, não analítica. Excelente desempenho foi obtido com o uso seqüencial de um método para IgM de grande sensibilidade seguido de um método que explora a qualidade da IgG (aglutinação diferencial e avidéz): especificidade diagnóstica clínica de cerca de 99%, mantendo sensibilidade de 95% ou superior. O pré-requisito positividade para IgG pode ter excluído amostras das duas primeiras semanas de infecção, quando nem todos os isotipos de anticorpos foram ainda expressos.

Para instituições públicas brasileiras, o melhor modelo sorológico na prevenção da toxoplasmose congênita em amostras isoladas deve ser a pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM usando testes automatizados sensíveis e específicos, com ensaio de captura para IgM. A avidéz deve ser realizada em todas as sorologias IgM positivas. Avidéz alta auxilia a excluir infecção aguda nas últimas 20 semanas de gestação. Avidéz baixa é associada com risco de transmissão que aumenta com a idade gestacional, portanto, IgM neonatal deve ser solicitada em todas as sorologias maternas IgM positivas com baixa avidéz. Recém-nascidos negativos, mesmo assintomáticos, devem ser cuidadosamente acompanhados durante o primeiro ano de vida para excluir toxoplasmose congênita.

## **CONCLUSÕES**

Destes resultados pode-se concluir que a avidéz de IgG realizada em amostras isoladas de gestantes IgM positivas pode determinar o risco de transmissão em qualquer idade gestacional, especialmente se os índices dos dois testes forem analisados em relação à idade gestacional. Este modelo sorológico pode ser menos oneroso para áreas de países em desenvolvimento com alta prevalência da infecção que o seguimento das gestantes suscetíveis com sorologias mensais até o parto e abre uma nova perspectiva na prevenção da toxoplasmose congênita.

## REFERENCES

- 1-BESSIÈRES, M.H.; BERREBI, A.; ROLLAND, M. *et al.* - Neonatal screening for toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. **Europ. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.**, **94**: 37-45, 2001.
- 2-CAMARGO, M.E. - Toxoplasmose. In: FERREIRA, A.W. & ÁVILA, S.L.M., ed. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2001. p. 278-288.
- 3-CIMON, B.; MARTY, P.; MORIN, O. - Specificity of low anti-*Toxoplasma* IgG titers with IMx and AxSYM Toxo IgG assays. **Diagn. Microbiol. infect. Dis.**, **32**: 65-67, 1998.
- 4-DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F. *et al.* - Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counseling. **Lancet**, **353**: 1829-1833, 1999.
- 5-FERREIRA, A. W. & CAMARGO, M.E. - Toxoplasmosis and the laboratory: diagnosis and a constant striving for improvement. **Rev. Inst. Med trop. S. Paulo**, **44**: 119-120, 2002.
- 6-FLORI, P.; TARDY, L.; PATURAL, H. *et al.* Reliability of Immunoglobulin G Antitoxoplasma Avidity Test and Effects of Treatment on Avidity Indexes of Infants and Pregnant Women. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **11**: 669-674, 2004.
- 7-FORESTIER, F.; HOHLFELD, P.; SOLE, Y. *et al.* Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by PCR: extended experience. **Prenat. Diagn.**, **18**: 405-415, 1998.

8-GUERINA, N.G.; HSU, H.-W.; MEISSNER, H.C. *et al.* - Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. New England Regional *Toxoplasma* Working Group. **New Engl. J. Med.**, **330**: 1858-1863, 1994.

9-HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPÄLÄ, I. *et al.* - Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. infect. Dis.**, **159**: 736-740, 1989.

10-HOLLIMAN, R.E.; RAYMOND, R.; RENTON, N. *et al.* - The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. **Epidem. Infect.**, **112**: 399-408, 1994.

11-JENUM, P.A.; STRAY-PEDERSEN, B.; GUNDERSEN, A.G. - Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of anti-*Toxoplasma* immunoglobulin G avidity. **J. clin. Microbiol.**, **35**: 1972-1977, 1997.

12-LAGO, E.G.; NETO, E.C.; MELAMED, J. *et al.* - Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in Porto Alegre, RS, Brazil. In: Proceedings of the International Conference on Toxoplasmosis, 2003, Copenhagen. **ANAIS**, Copenhagen: The Panum Institute, University of Copenhagen, 2003.

13-LAPPALAINEN, M.; KOSKELA, P.; KOSKINIEMI, M. *et al.* - Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. **J. infect. Dis.**, **167**: 691-697, 1993.

14-LEBECH, M.; JOYNSON, D.H.; SEITZ, M. *et al.* - Classification and case definitions of *T. gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. **Europ. J. clin. Microbiol. infect. Dis.**, **15**: 799-805, 1996.

15-LEBECH, M.; ANDERSEN, O.; CHRISTENSEN, N.C. *et al.* - Feasibility of neonatal screening for toxoplasmosis infection in the absence of prenatal treatment. Danish congenital toxoplasmosis study group. **Lancet**, **353**: 1834-1837, 1999.

- 16- LYNFIELD, R.; HSU, H.W. & GUERINA, N.G. - Screening methods for *Toxoplasma* and risk of disease. **Lancet**, **353**: 1899-1900, 1999.
- 17-MONTOYA, J.G. - Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **J. infect Dis.**, **185 (suppl.1)**: S73-S82, 2002.
- 18-MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O.; KINNEY, S. *et al.* - VIDAS Test for Avidity of *Toxoplasma*-specific Immunoglobulin G for Confirmatory Testing of Pregnant Women. **J. clin. Microbiol.**, **40**: 2504-2508, 2002.
- 19-PELLOUX, H.; GUY, E.; ANGELICI, M.C. *et al.* A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. **FEMS Microbiol. Lett.**, **165**: 231-237, 1998.
- 20-RICCI, M.; PENTIMALLI, H.; THALLER, R. *et al.* Screening and prevention of congenital toxoplasmosis: an effectiveness study in a population with a high infection rate. **J. Matern. Fetal Neonatal Med.**, **14**: 398-403, 2003.
- 21-ROBERT-GANGNEUX, F.; GAVINET, M.-F.; ANCELLE, T. *et al.* - Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. **J. clin. Microbiol.**, **37**: 2893-2898, 1999.
- 22-ROBERTS, A.; HEDMAN, K.; LUYASU, V. *et al.*- Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. **Europ. J. clin. Microbiol. infect. Dis.**, **20**: 467-474, 2001.
- 23-ZOTTI, C.; CHARRIER, L.; GIACOMUZZI, M. *et al.* - Use of Avidity test in case definition of toxoplasmosis in pregnancy. **New Microbiol.**, **27**: 17-20, 2004.
- 24-WALLON, M.; LIOU, C.; GARNER, P. & PEYRON, F. - Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. **Brit. med. J.**, **318**: 1511-1514, 1999.

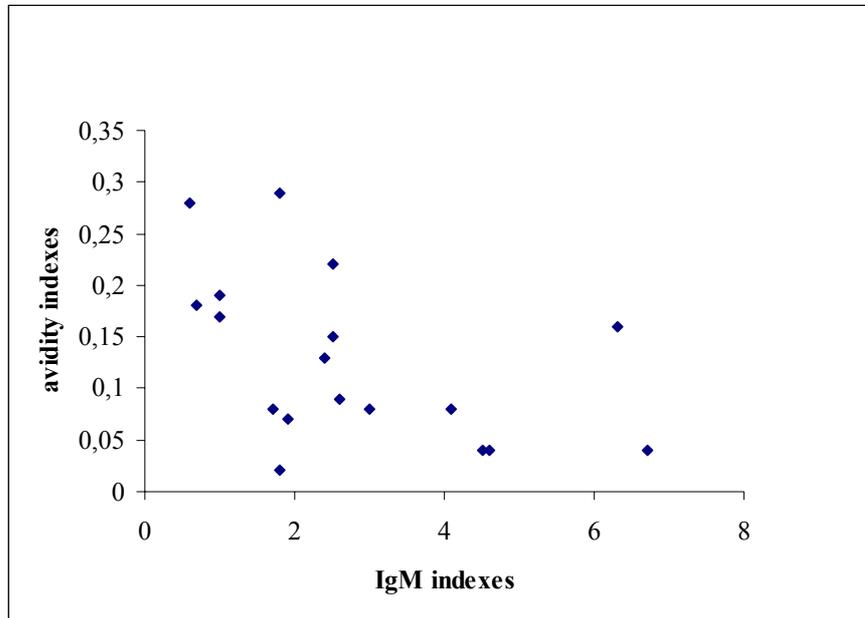
25-WILSON, M.; SCHANTZ, P.M. & TSANG, V.C.W. - Clinical Immunoparasitology. In: ROSE, N.R.; MACARIO, E.C.; FOLDS, J.D.; CLIFFORD LANE, H. & NAKAMURA, R.M., ed. **Manual of clinical laboratory Immunology**. Washington, American Society for Microbiology, 1997. p. 575-584.

26-WONG, S.Y. & REMINGTON, J.S. -Toxoplasmosis in pregnancy. **Clin. infect. Dis.**, **18**: 853-861, 1994.

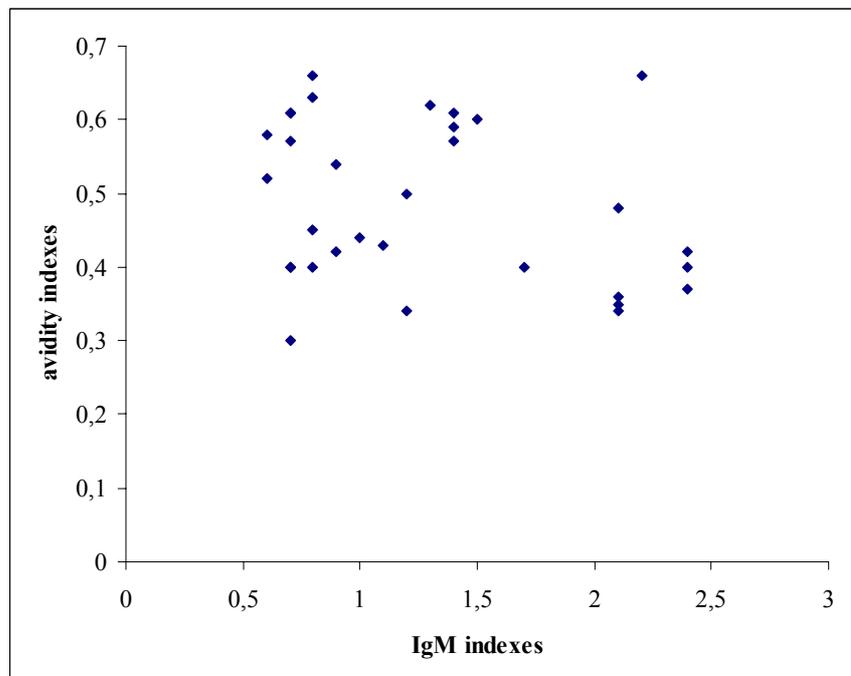
**Tabela 1** - Mães com IgM positiva ou inconclusiva e avidéz baixa ou inconclusiva, em relação à idade gestacional e à IgM neonatal.

Mães	I.G.	IgG IU/ml		IgM	Avidéz	IgM neonatal
	trimestre	ELFA	MEIA	índices	índices	índices
M1	3 <sup>o</sup>	3356	>300	11.9	0.05	positiva (7.9)
M2	3 <sup>o</sup>	112	173	6.7	0.04	positiva (6.5)
M3	1 <sup>o</sup>	2656	> 300	6.3	0.16	negativa
M4	1 <sup>o</sup>	1060	> 300	4.6	0.04	negativa
M5	3 <sup>o</sup>	155	>300	4.5	0.04	positiva (9.3)
M6	3 <sup>o</sup>	748	>300	4.1	0.08	negativa
M7	3 <sup>o</sup>	560	> 300	3.0	0.08	negativa
M8	2 <sup>o</sup>	176	100	2.6	0.09	negativa
M9	3 <sup>o</sup>	352	> 300	2.5	0.15	negativa
M10	3 <sup>o</sup>	360	> 300	2.5	0.22	negativa
M11	2 <sup>o</sup>	244	> 300	2.4	0.13	positiva (1.4)
M12	3 <sup>o</sup>	2000	> 300	1.9	0.07	natimorto
M13	3 <sup>o</sup>	212	165	1.8	0.02	positiva (2.9)
M14	2 <sup>o</sup>	148	79	1.8	0.29	negativa
M15	2 <sup>o</sup>	280	277	1.7	0.08	negativa
M16	2 <sup>o</sup>	820	> 300	1.0	0.17	negativa
M17	2 <sup>o</sup>	460	> 300	1.0	0.19	negativa
M18	3 <sup>o</sup>	1416	>300	0.7	0.18	negativa
M19	3 <sup>o</sup>	106	28	0.6	0.28	negativa

**FIGURA 1** - A correlação moderada e inversa entre os índices de IgM e de avidéz obtidos em amostras com avidéz baixa ( $r = -0.472$ ,  $p = 0.041$ )



**FIGURA 2** - A correlação não-significativa entre os índices de IgM e de avidéz, obtidas nas amostras com alta avidéz. ( $r = -0.275$ ,  $p = 0.128$ )



## ANEXO C

### ***TOXOPLASMA*-IgM and IgG-avidity in single samples from areas with a high infection rate can determine the risk of mother-to-child transmission**

Myrian Morussi REIS (1,2,3), Maria Madalena TESSARO (1) & Pedro Alves D'AZEVEDO (2)

(1) Immunology Section at Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, Porto Alegre, RS, Brazil.

(2) Department of Microbiology and Parasitology at Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

(3) Graduate Program in Clinical Pathology at Fundação Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

#### **Correspondence to:**

Myrian Morussi Reis, Rua Hilário Ribeiro, 15/202, Bairro Moinhos de Vento, 90510-040 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

## SUMMARY

Anti-*Toxoplasma* IgG-avidity was determined in 168 serum samples from IgG- and IgM-positive pregnant women at various times during pregnancy, in order to evaluate the predictive value for risk of mother-to-child transmission in a single sample, taking the limitations of conventional serology into account. The neonatal IgM was considered the serologic marker of transmission. Fluorometric tests for IgG, IgM (immunocapture) and IgG-avidity were performed. Fifty-one of the 128 pregnant women tested gave birth in the hospital and neonatal IgM was obtained. The results showed 32 (62.75%) pregnant women having high avidity, IgM indexes between 0.6 and 2.4, and no infected newborn. Nineteen (37.25%) had low or inconclusive avidity, IgM indexes between 0.6 and 11.9, and five infected newborns and one stillbirth. In two infected newborns and the stillbirth maternal IgM indexes were low and in one infected newborn the only maternal parameter that suggested fetal risk was IgG-avidity. In the present study, IgG-avidity performed in single samples from positive IgM pregnant women helped to determine the risk of transmission at any time during pregnancy, especially when the indexes of the two tests were analysed with respect to gestational age. This model may be less expensive in developing countries where there is a high prevalence of infection than the follow-up of susceptible mothers until childbirth with monthly serology, and it creates a new perspective for the diagnosis of congenital toxoplasmosis.

**KEYWORDS:** Congenital toxoplasmosis; Serology for toxoplasmosis; IgG-avidity.

## RESUMO

### ***TOXOPLASMA*-IgM and IgG-avidity in single samples from areas with a high infection rate can determine the risk of mother-to-child transmission**

A avidéz de IgG anti-*Toxoplasma* foi realizada em 168 amostras IgG e IgM positivas de gestantes, coletadas em qualquer período da gestação, para avaliar o valor preditivo do risco de transmissão materno-fetal em amostra única, considerando as limitações da sorologia convencional. A IgM neonatal foi considerada o marcador sorológico de transmissão. Testes fluorométricos foram realizados para IgG, IgM (imunocaptura) e avidéz de IgG. Cinquenta e uma das 128 gestantes testadas tiveram os partos realizados na instituição e a IgM neonatal foi obtida. Os resultados mostraram 32 (62.75%) gestantes com avidéz alta, índices de IgM entre 0,6 e 2,4 e nenhum recém-nascido infectado. Dezenove (37.25%) tiveram avidéz baixa ou inconclusiva, índices de IgM entre 0,6 e 11,9, cinco recém-nascidos infectados e um natimorto. Em dois recém-nascidos infectados e no natimorto, os índices maternos de IgM foram baixos e em um recém-nascido infectado, o único parâmetro materno que sugeriu risco para o feto foi a avidéz de IgG. No presente estudo, a avidéz de IgG realizada em amostras isoladas de gestantes IgM positivas auxiliou a determinar o risco de transmissão durante toda a gestação, especialmente quando os índices dos dois testes foram analisados em relação à idade gestacional. Este modelo pode ser menos oneroso para países em desenvolvimento com alta prevalência da infecção e cria uma nova perspectiva para o diagnóstico da toxoplasmose congênita.

## INTRODUCTION

The risk of mother-to-child transmission of *Toxoplasma gondii* and the severity of sequelae in congenital infection have been correlated with gestational age in which maternal seroconversion occurs<sup>4</sup>. Significant reduction in the frequency and severity of disease at birth have been associated with *in utero* treatment of infected fetuses<sup>1,16</sup>, even though treatment does not prevent transmission of the parasite<sup>24</sup>. The high prevalence of *Toxoplasma* infection in pregnant women from Porto Alegre has led to the use of serological screening in the local health care system<sup>12</sup>.

IgM antibodies may appear earlier and decline more rapidly than IgG antibodies and are frequently the first class of antibodies detected after primary infection<sup>17</sup>. Despite the wide distribution of commercial kits to measure IgM antibodies, they lack standardization; therefore, quantitative results from different manufacturers cannot be compared. Several methods for IgM detection still have a high frequency of false-positives and in some patients, positive IgM is "residual", detected during the chronic phase of infection. A positive IgM result in an isolated sample can be interpreted as a true-positive in acute infection, a true-positive in chronic infection or as a false-positive<sup>17</sup>.

The IgM indexes measured in acute infection are significantly higher than those in residual ones<sup>25</sup>. With ELFA- enzyme-linked fluorescent assay, VIDAS system, increasing IgM indexes or over 3.5 were observed in acute infection, indexes between 3.0 and 3.5 in the transitional phase, and indexes between 0.65 and 3.0 in latent infection<sup>2</sup>.

An IgM test should be performed by a procedure with minimal nonspecific reaction, such as IgM-capture EIA<sup>2,5,25</sup>. The algorithm for serodiagnosis of toxoplasmosis in the USA includes an IgM measurement when time of infection needs to be defined. If IgM is positive at elevated indexes, infection has probably occurred in the prior three to six months. If it is positive at low indexes it may be a false-positive, be related to infection acquired in the prior

two years or be related to reinfection. If it is negative, infection has occurred more than two years before. In individuals presenting with low IgM indexes, it was suggested by the authors that a second sample be collected, with both processed together to safely detect an increase of antibody levels<sup>25</sup>. In pregnant women with low IgM indexes, it is difficult to determine the time of infection and exclude the possibility of transmission.

In 1989, HEDMAN *et al.*<sup>9</sup> introduced the IgG-avidity test to help diagnose acute infection based on the binding strength of specific IgG to a multivalent antigen of the parasite, which is produced at low concentrations after primary infection and increases over time. High avidity at the beginning of pregnancy has been used as a parameter to exclude post-conception infection<sup>9, 10</sup>.

The risk of acute infection, parasitemia and mother-to-child transmission has been associated with high levels of IgG<sup>14</sup>, presence of IgM<sup>14</sup> or IgM at high levels<sup>2,14,25</sup> and low IgG-avidity<sup>5,9,11,13,18,22,23</sup>. Serological responses, however, follow diverse, individual rhythms. Low avidity, as well as the presence of IgM can be detected long after primary infection in some individuals. High and even very high IgG is not always observed in acute infection, especially during the first weeks<sup>11</sup>.

At Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas in Porto Alegre, serology for toxoplasmosis is requested at the first prenatal visit, but the follow-up of susceptible pregnant women is poorly conducted or is not done at all. Samples from positive IgG and IgM pregnant women, who start prenatal care late or are serologically tested only at the time of labor, are commonly seen. It would be value if the patients' immune status could be obtained of these single samples, bearing in mind that ultrasonography, amniocentesis and PCR (polymerase chain reaction) are requested based on it.

The aim of this study was, therefore, to evaluate IgG-avidity in samples from IgG- and IgM-positive pregnant women in relation to its capacity to identify the risk of mother-to-child transmission of *Toxoplasma* from single samples, requested at any time during pregnancy, considering the limitations of conventional serology. Specific IgG levels and specific IgM and IgG-avidity indexes were analyzed, and neonatal IgM was used as the serologic marker of mother-to-child transmission.

## PATIENTS AND METHODS

Anti-*T. gondii* IgG-avidity was prospectively determined in all positive IgG and IgM samples obtained from pregnant women at their first prenatal visit to Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, between 2000 and 2004, regardless of gestational age. Fifty-one mothers gave birth at the hospital. A newborn blood sample was drawn to process specific IgG and IgM.

IgG anti- *T. gondii* was performed using the MEIA, AxSYM<sup>®</sup> SYSTEM Toxo IgG commercial kit (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). Results were expressed as International Units per milliliter (IU/ml), negative: < 2.0, positive: > 3.0, inconclusive: between 2.0 and 3.0.

IgM anti- *T. gondii* was performed using the ELFA, VIDAS TOXO IgM, TXM commercial kit (bioMérieux SA, Lyon, France). The results were expressed as indexes, negative: < 0.55, positive: > 0.65, inconclusive: between 0.55 and 0.65.

VIDAS AVIDITY was also performed using the ELFA commercial kit and the results were expressed as indexes, low: < 0.2, high: > 0.3, inconclusive: between 0.2 and 0.3.

Newborn specific IgG and IgM were processed with the same techniques.

Fisher's Exact test was used to analyze (a) the association between categorized IgM and transmission, (b) categorized IgM and categorized avidity and (c) categorized avidity and transmission. The Student *t* test was used to analyze the association between avidity index and transmission. The Pearson correlation was used to analyze the correlation between IgM and avidity indexes.

The project was approved by the Ethics Committee of the Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas.

## RESULTS

IgG-avidity was performed on 168 samples from positive IgG and IgM pregnant women (about 2.5% of the total number of serologies performed during this period) and was high in 128 (76%) and low or inconclusive in 40 (24%). The gestational age was known in 105 women (62.5%) of which 33 (31.4%) were in the first, 36 (34.3%) in the second and 36 (34.3%) in the third trimester of gestation. Fifty-one mothers (30%) gave birth at the hospital, thus making it possible to obtain neonatal IgM.

Among the 128 pregnant women with high avidity, 32 gave birth at the hospital. IgG levels ranged from 58 to 8,832 IU/ml and IgM indexes ranged between 0.65 and 2.4. Eighteen mothers had low IgM indexes (between 1.0 and 3.0) and 14 only very low amounts of IgM (between 0.65 and 0.9). Eleven mothers were in the first, seven in the second and 14 the third trimester of gestation. Neonatal IgM tests were negative in all newborns.

Among the 40 pregnant women with low or inconclusive avidity, 19 gave birth at the institution (Table 1). IgG levels ranged from 106 to 3,356 IU/ml and IgM indexes from 0.65 to 11.9. Six mothers had IgM indexes higher than 3.5 and avidity very low (M1 to M6), 11 had low IgM indexes (between 1.0 and 3.0) and two only traces of IgM (between 0.65 and 0.9). Two mothers were in the first, six were in the second and 11 were in the third trimester of gestation.

Five positive IgM newborns (M1, M2, M5, M11 and M13) and one stillbirth (M12) resulted from these mothers. In three infected newborns (M1, M2 and M5), the maternal IgM indexes were extremely high and in two infected newborns (M11 and M13) and the stillbirth (M12) these indexes were low. Maternal serologies of M2 and M5 were very similar: low levels of IgG and high indexes of IgM.

According to the Fisher's Exact test, there is a statistically significant association between categorized IgM of mothers (index higher than 3.0) and transmission ( $p < 0.028$ ),

neonatal IgM being the serologic marker of transmission. High IgM is predicted to result in a higher number of infected children than low or inconclusive IgM. There is also a statistically significant association between categorized IgM and categorized avidity ( $p < 0.001$ ), high IgM being associated with low avidity and vice-versa. There is also an association between categorized avidity and transmission ( $p < 0.001$ ), low avidity associated with transmission and high avidity associated with lack of transmission using the manufacturer threshold of 0.2. Reducing the threshold to 0.15 increases the association between low avidity and transmission. According to the Student  $t$  test, there is an association between the avidity index and transmission ( $p < 0.001$ ), with a lower avidity index associated with a higher chance of transmission.

According to the Pearson correlation, there is a significant correlation between IgM and avidity indexes, moderately and inversely. Thus, a high avidity index corresponds to a low IgM index and vice-versa ( $r = - 0.548$ ,  $p < 0.001$ ). The relationship between IgM and avidity indexes when avidity is low, is shown in Figure 1 ( $r = - 0.472$ ;  $p = 0.041$ ), and when it is high, in Figure 2 ( $r = - 0.275$ ;  $p = 0.128$ ).

## DISCUSSION

When routine testing for *Toxoplasma* antibodies is performed in pregnant women, the first serum sample is usually taken at the first antenatal health care visit confirming pregnancy, usually between eight and twelve weeks. At Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, the first serum sample from a pregnant woman is frequently obtained later, after 20 weeks of pregnancy, or even as a parturient. If the presence of IgM antibodies in single samples is the parameter used to identify acute infection, many women will be falsely identified as probably or possibly infected, according to the classification system produced by the working group of the European Research Network on Congenital Toxoplasmosis<sup>14</sup>, and they will undergo unnecessary diagnostic amniocentesis and/or antiparasitic treatment.

For these reasons, positive IgG and IgM in single samples were analyzed with regard to three parameters, IgG in IU/ml by MEIA and ELFA and IgM and IgG-avidity indexes by ELFA. The parameters were compared to neonatal infection determined by neonatal IgM, in order to assess the risk of mother-to-child transmission. The absence of neonatal IgM in the 32 infants born to mothers with high avidity, low indexes of IgM and even very high levels of IgG reinforces the importance of high avidity in evaluating the risk of transmission in any gestational age.

The presence of neonatal IgM in five infants born to mothers with low avidity and one stillbirth reinforces the importance of low avidity concerning the risk of transmission when it is measured in IgM-positive pregnant women. High indexes of IgM (M1, M2 and M5) also support the importance of IgM levels concerning the risk of transmission. M3 and M4 were under 20 weeks and their neonates were IgM negative, probably because the risk of transmission is lower in the first half of pregnancy.

The VIDAS avidity test has been standardized and optimized to exclude recent seroconversion in pregnant women presenting with elevated anti-*Toxoplasma* IgM levels in the first trimester of pregnancy<sup>6</sup>. The association between categorized avidity and transmission ( $p < 0.001$ ) using the manufacturer recommended threshold of 0.2 is increased when reducing the threshold from 0.2 to 0.15, with six cases of fetal transmission resulting from 12 mothers.

Without measuring avidity, the infected infants born to M11 and M13 with low levels of IgG and low indexes of IgM would not have been detected during pregnancy. In one infected newborn (M13), the only maternal parameter that strongly suggested fetal risk was IgG-avidity. These are the results from conventional serologies, most difficult to correlate with the risk of transmission, as IgM can be residual in a descending curve.

The moderate and inverse correlation between IgM and avidity indexes obtained in the samples with low avidity (Fig. 1) in this series ( $r = - 0.472$ ,  $p = 0.041$ ) is very similar to the correlation found by JENUM *et al.*<sup>11</sup> between avidity indexes and estimated the time of infection ( $r = 0.46$ ). The correlation between IgM and avidity indexes obtained in the samples with high avidity (Fig. 2) in this series ( $r = - 0.275$ ,  $p = 0.128$ ) is non-significant, meaning that high avidity did not show any relationship with IgM. There was a better association of transmission with avidity ( $p < 0.001$ ) than with categorized IgM, index higher than 3.0 ( $p < 0.028$ ).

The dynamics of antibody formation must be remembered in interpreting the maternal results, especially in single samples. Considering the screening techniques used at Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, the sensitivity of MEIA-IgG<sup>3</sup> and the capture design of ELFA-IgM<sup>2</sup>, the risk of mother-to-child transmission is related to the time of antibody appearance: (1<sup>st</sup>) IgM > 3.0/ IgG < 20 UI/ml, (2<sup>nd</sup>) IgM > 3.0/ IgG between 20 and 300 UI/ml, (3<sup>rd</sup>) IgM > 3.0/ IgG > 300 UI/ml, (4<sup>th</sup>) IgM < 3.0/ IgG positive at any level. The last

group, therefore, benefit most from obtaining the result of avidity, with low avidity indicating a higher risk, high avidity indicating a lower risk of transmission.

In JENUM *et al.*<sup>11</sup> series, high IgG-avidity (above 20%), can be used to exclude recent acute infection in the first 20 weeks, which reinforces the findings by LAPPALAINEN *et al.*<sup>13</sup> who found a positive predictive value of 100% for high avidity in the five preceding months.

In FLORI *et al.* series<sup>6</sup>, the increase of avidity indexes was low; the average time to reach the threshold of 0.3 was 14.2 months. No women reach this threshold either at four months or at six months after seroconversion. According to the authors, it is justifiable to decrease the threshold for exclusion of a recent infection of less than four months to 0.2 and use the company threshold of 0.3 for exclusion of infections which have occurred more than six months ago. The kinetics of the avidity test in five groups of women based on the type and duration of treatment given has also been evaluated and there was no significant difference when comparisons were made between the groups.

The best approach to prevent and control congenital toxoplasmosis is not clear. In France, a country with a high prevalence of infection, prevention is performed through serological screening and follow-up of susceptible mothers until childbirth with monthly serology<sup>1,16,21</sup>. Seroconversion indicates maternal acute infection. Parasite detection in amniotic fluid can be performed by in vitro culture, mouse inoculation and PCR to confirm fetal infection.

PCR for detection of *T. gondii* has revolutionized prenatal diagnosis by enabling an early diagnosis to be made, thereby avoiding the use of more invasive procedures on the fetus, thanks to its sensitivity, specificity and rapidity<sup>7,17</sup>. However, the results of a European collaborative study highlighted the lack of homogeneity between PCR protocols and performance and underlined the need for an external quality assurance scheme<sup>19</sup>. There are,

also, marked differences in PCR sensitivity depending on gestational age at the time of the amniocentesis. Furthermore, PCR on amniotic fluid is not recommended for HIV-infected women, because of the risk of transmitting the HIV virus to the fetus during the procedure<sup>17</sup>.

DUNN *et al.*<sup>4</sup> analyzed the status of congenital infection in 554 cases. The overall maternal-fetal transmission rate was 29%, which masked a sharp increase in risk from 6% at 13 weeks to 72% at 36 weeks. Women who seroconverted at 24-30 weeks carried the highest risk (10%) of having a congenitally infected child with early clinical signs and at risk of long-term complications.

Most infected newborn babies do not have overt signs of disease at birth but are at substantial risk of developing long-term sequelae: chorioretinal disease in up to 85% of infected children and neurological abnormalities. Marked reductions in frequency and severity of disease at birth have been associated with *in utero* treatment. Significant reductions in expected long-term complications have been associated with extended post-natal treatment regimens started in the newborn period or as a continuation of *in utero* treatment<sup>1,16,21</sup>.

Despite the use of advanced methods, some cases of congenital toxoplasmosis cannot be detected early, which underlines the importance of careful follow-up of newborns at risk<sup>21</sup>. In Denmark, a country with a low prevalence of infection, a neonatal screening programme based solely on detection of *Toxoplasma*-specific IgM antibodies evaluated from the PKU card could identify more than 75% of infected infants born to untreated mothers<sup>15</sup>. This strategy could be the most appropriate one for countries with a low prevalence of infection<sup>8,15</sup>. In the United States, an isolated serum sample, often obtained either late in the first trimester or during the second or third trimester, is the only source of information on whether the fetus is at risk<sup>26</sup>.

RICCI *et al.*<sup>20</sup> compared the results of the two approaches in a population with a high infection rate in order to evaluate the effectiveness of these strategies in 5,288 susceptible pregnancies, 188 identified as infected, and 9,730 neonates. In this series, neonatal screening for toxoplasmosis seems to be less effective than pregnancy screening. In a study from Porto Alegre, neonatal screening identified cases of congenital toxoplasmosis acquired and transmitted in late pregnancy and undetected by prenatal screening<sup>12</sup>.

There is a high prevalence of congenital toxoplasmosis in Porto Alegre<sup>12</sup>. Prevention programmes using single samples should be approached carefully. It is necessary to choose the best combination of assays<sup>11,22</sup>. Because the IgG-avidity test is largely employed as a 2<sup>nd</sup> level test, 117 cases of toxoplasmosis in pregnancy divided into the risk categories according to Lebech's criteria were re-examined including avidity that could define 77 out of 117 (65.8%) with only a single serum sample. The avidity test proved to be a useful method to classify the *Toxoplasma* infection in a single serum sample, especially during pregnancy<sup>23</sup>.

A large European multicenter study<sup>22</sup> explored the diagnostic performances of 20 antibody assays and their combinations in assessing the time of primary infection with *T. gondii*. The sample criteria permitted evaluation of test performance in terms of clinical sensitivity and specificity rather than analytical sensitivity and specificity. Excellent diagnostic performances, specificity near 99% maintaining sensitivities of 95% or higher, were reached by sequential use of highly sensitive IgM assays and methods that explored IgG quality, differential agglutination and avidity assays. The prerequisite for IgG seropositivity may have ruled out samples in the first two weeks of infection, when not all the antibody isotypes have yet been expressed.

For Brazilian public health institutions, the best serological model to prevent congenital toxoplasmosis using single samples would be analyzing for IgG and IgM antibodies

using sensitive methods. Avidity should be done in all positive IgM serologies. High avidity helps to exclude acute infection in the last 20 weeks. Low avidity is associated with risk of transmission which increases during gestation; therefore, neonatal IgM should be performed in all low IgG-avidity maternal serologies. Negative neonates, even asymptomatics, should be carefully followed-up during the first year to exclude congenital toxoplasmosis.

## **CONCLUSIONS**

From these results it can be concluded that IgG-avidity performed in single samples from positive anti-*Toxoplasma* IgM pregnant women can determine the risk of transmission at any time during pregnancy, especially if the indexes of the two tests are analysed compared to gestational age. This model may be less expensive in developing countries with a high infection rate than the follow-up of susceptible mothers until childbirth with monthly serology, and it creates a new perspective for the diagnosis of congenital toxoplasmosis.

## REFERENCES

- 1-BESSIÈRES, M.H.; BERREBI, A.; ROLLAND, M. *et al.* - Neonatal screening for toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. **Europ. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.**, **94**: 37-45, 2001.
- 2-CAMARGO, M.E. - Toxoplasmosse. In: FERREIRA, A.W. & ÁVILA, S.L.M., ed. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2001. p. 278-288.
- 3-CIMON, B.; MARTY, P.; MORIN, O. - Specificity of low anti-*Toxoplasma* IgG titers with IMx and AxSYM Toxo IgG assays. **Diagn. Microbiol. infect. Dis.**, **32**: 65-67, 1998.
- 4-DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F. *et al.* - Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counseling. **Lancet**, **353**: 1829-1833, 1999.
- 5-FERREIRA, A. W. & CAMARGO, M.E. - Toxoplasmosis and the laboratory: diagnosis and a constant striving for improvement. **Rev. Inst. Med trop. S. Paulo**, **44**: 119-120, 2002.
- 6-FLORI, P.; TARDY, L.; PATURAL, H. *et al.* Reliability of Immunoglobulin G Antitoxoplasma Avidity Test and Effects of Treatment on Avidity Indexes of Infants and Pregnant Women. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **11**: 669-674, 2004.
- 7-FORESTIER, F.; HOHLFELD, P.; SOLE, Y. *et al.* Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by PCR: extended experience. **Prenat. Diagn.**, **18**: 405-415, 1998.
- 8-GUERINA, N.G.; HSU, H.-W.; MEISSNER, H.C. *et al.* - Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. New England Regional *Toxoplasma* Working Group. **New Engl. J. Med.**, **330**: 1858-1863, 1994.

9-HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPÄLÄ, I. *et al.* - Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. infect. Dis.**, **159**: 736-740, 1989.

10-HOLLIMAN, R.E.; RAYMOND, R.; RENTON, N. *et al.* - The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. **Epidem. Infect.**, **112**: 399-408, 1994.

11-JENUM, P.A.; STRAY-PEDERSEN, B.; GUNDERSEN, A.G. - Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of anti-*Toxoplasma* immunoglobulin G avidity. **J. clin. Microbiol.**, **35**: 1972-1977, 1997.

12-LAGO, E.G.; NETO, E.C.; MELAMED, J. *et al.* - Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in Porto Alegre, RS, Brazil. In: Proceedings of the International Conference on Toxoplasmosis, 2003, Copenhagen. **ANAIS**, Copenhagen: The Panum Institute, University of Copenhagen, 2003.

13-LAPPALAINEN, M.; KOSKELA, P.; KOSKINIEMI, M. *et al.* - Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. **J. infect. Dis.**, **167**: 691-697, 1993.

14-LEBECH, M.; JOYNSON, D.H.; SEITZ, M. *et al.* - Classification and case definitions of *T. gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. **Europ. J. clin. Microbiol. infect. Dis.**, **15**: 799-805, 1996.

15-LEBECH, M.; ANDERSEN, O.; CHRISTENSEN, N.C. *et al.* - Feasibility of neonatal screening for toxoplasmosis infection in the absence of prenatal treatment. Danish congenital toxoplasmosis study group. **Lancet**, **353**: 1834-1837, 1999.

16- LYNFIELD, R.; HSU, H.W. & GUERINA, N.G. - Screening methods for *Toxoplasma* and risk of disease. **Lancet**, **353**: 1899-1900, 1999.

17-MONTOYA, J.G. - Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **J. infect Dis., 185 (suppl.1):** S73-S82, 2002.

18-MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O.; KINNEY, S. *et al.* - VIDAS Test for Avidity of *Toxoplasma*-specific Immunoglobulin G for Confirmatory Testing of Pregnant Women. **J. clin. Microbiol., 40:** 2504-2508, 2002.

19-PELLOUX, H.; GUY, E.; ANGELICI, M.C. *et al.* A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. **FEMS Microbiol. Lett., 165:** 231-237, 1998.

20-RICCI, M.; PENTIMALLI, H.; THALLER, R. *et al.* Screening and prevention of congenital toxoplasmosis: an effectiveness study in a population with a high infection rate. **J. Matern. Fetal Neonatal Med., 14:** 398-403, 2003.

21-ROBERT-GANGNEUX, F.; GAVINET, M.-F.; ANCELLE, T. *et al.* - Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. **J. clin. Microbiol., 37:** 2893-2898, 1999.

22-ROBERTS, A.; HEDMAN, K.; LUYASU, V. *et al.*- Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. **Europ. J. clin. Microbiol. infect. Dis., 20:** 467-474, 2001.

23-ZOTTI, C.; CHARRIER, L.; GIACOMUZZI, M. *et al.* - Use of Avidity test in case definition of toxoplasmosis in pregnancy. **New Microbiol., 27:** 17-20, 2004.

24-WALLON, M.; LIOU, C.; GARNER, P. & PEYRON, F. - Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. **Brit. med. J., 318:** 1511-1514, 1999.

25-WILSON, M.; SCHANTZ, P.M. & TSANG, V.C.W. - Clinical Immunoparasitology. In: ROSE, N.R.; MACARIO, E.C.; FOLDS, J.D.; CLIFFORD LANE,

H. & NAKAMURA, R.M., ed. **Manual of clinical laboratory Immunology**. Washington, American Society for Microbiology, 1997. p. 575-584.

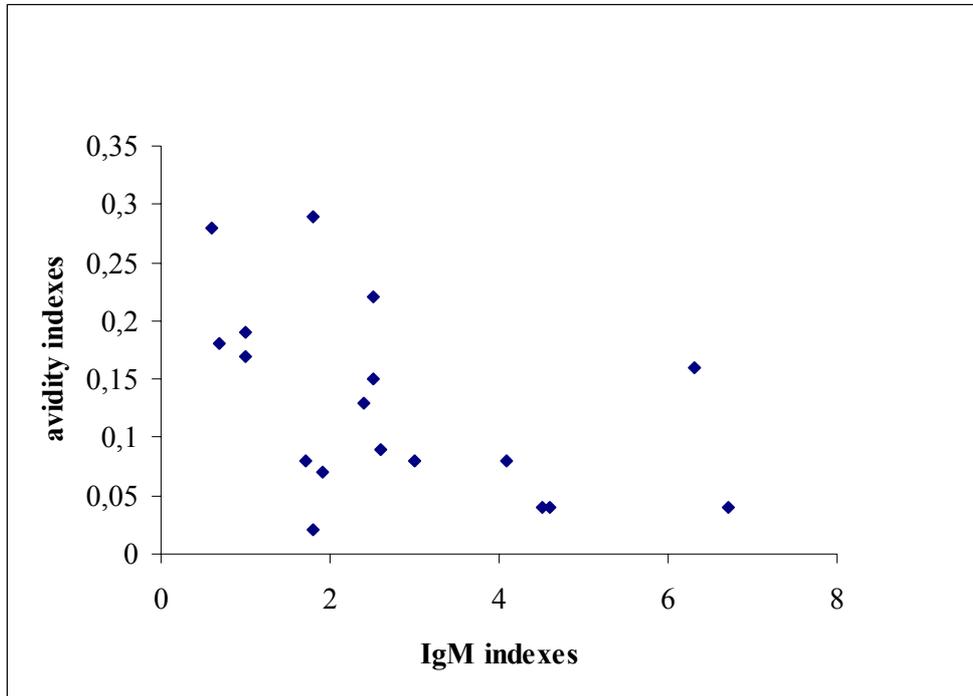
26-WONG, S.Y. & REMINGTON, J.S. -Toxoplasmosis in pregnancy. **Clin. infect. Dis.**, **18**: 853-861, 1994.

**Table 1** - Mothers with positive or inconclusive IgM and low or inconclusive avidity, according to gestational age and neonatal IgM

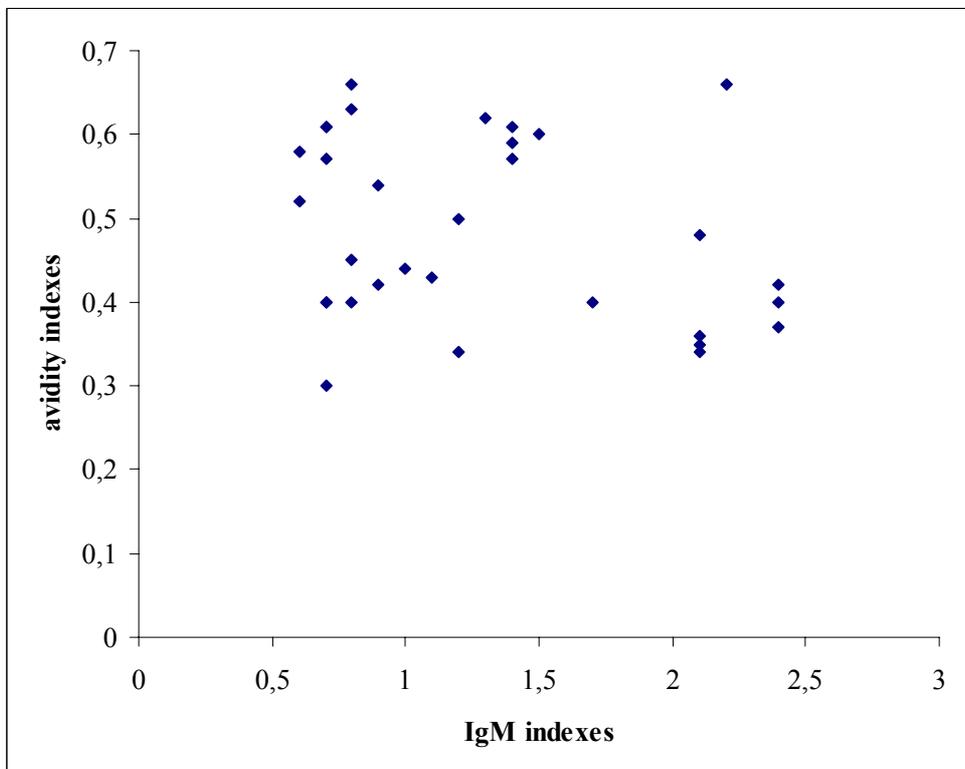
Mother	Gestational age-trimester	IgG IU/ml		IgM indexes	Avidity indexes	Neonate IgM indexes
		ELFA	MEIA			
M1	3rd	3356	>300	11.9	0.05	positive (7.9)
M2	3rd	112	173	6.7	0.04	positive (6.5)
M3	1st	2656	> 300	6.3	0.16	negative
M4	1st	1060	> 300	4.6	0.04	negative
M5	3rd	155	>300	4.5	0.04	positive (9.3)
M6	3rd	748	>300	4.1	0.08	negative
M7	3rd	560	> 300	3.0	0.08	negative
M8	2nd	176	100	2.6	0.09	negative
M9	3rd	352	> 300	2.5	0.15	negative
M10	3rd	360	> 300	2.5	0.22	negative
M11	2nd	244	> 300	2.4	0.13	positive (1.4)
M12	3rd	2000	> 300	1.9	0.07	stillbirth
M13	3rd	212	165	1.8	0.02	positive (2.9)
M14	2nd	148	79	1.8	0.29	negative
M15	2nd	280	277	1.7	0.08	negative
M16	2nd	820	> 300	1.0	0.17	negative
M17	2nd	460	> 300	1.0	0.19	negative
M18	3rd	1416	>300	0.7	0.18	negative
M19	3rd	106	28	0.6	0.28	negative

**Figure 1-** The moderate and inverse correlation between IgM and avidity

indexes obtained in the samples with low avidity ( $r = -0.472$ ,  $p = 0.041$ ).



**Figure 2-** The non-significant correlation between IgM and avidity indexes, obtained in samples with high avidity. ( $r = -0.275$ ,  $p = 0.128$ ).



## **POSFÁCIO**

Temos três fases distintas em nossa jornada profissional. Na primeira, buscamos a área de trabalho em que possamos nos expressar como indivíduos num contexto mais amplo do que o familiar, garantindo a sobrevivência e aprimorando a espécie. A Medicina foi a minha opção profissional, mais especificamente, a Medicina Laboratorial.

Na segunda, buscamos a bagagem de conhecimentos específicos, preferentemente a partir da vivência, fonte de motivação. Na Medicina Laboratorial descobri inúmeras oportunidades de melhorar a qualidade de vida de meus semelhantes através do diagnóstico preciso. A especialização em Imunologia e Alergia Clínica proporcionou-me a compreensão da resposta imunológica a microrganismos de identificação difícil e da relevância deste tema em saúde pública. A alternância de trabalho no Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, instituição pública, e no Laboratório Weinmann, instituição privada, ensinou-me a perseguir o maior número de informações em uma amostra biológica pelo menor custo.

Na terceira e última fase buscamos transmitir nossa experiência formando novos profissionais motivados nesta construção do conhecimento, sem perder os valores transmitidos pelos nossos verdadeiros mestres. Assim, tornar-me professora da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre e aluna da Pós-Graduação de Patologia Geral foi uma decorrência previsível.

A busca do Doutorado tem, no entanto, um significado diverso: representa a oportunidade de estreitar laços entre a Patologia Geral e a Patologia Clínica, aberta pelos professores desta Pós-Graduação que vêem estas duas áreas do exercício da Medicina como expressões distintas e complementares do mesmo processo. Esta defesa é uma contribuição modesta, mas tenho a convicção de que a porta permanecerá aberta para muitos profissionais.

Myrian Morussi Reis

# 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](#)