

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

TATIANE LUIZA DA COSTA

Otimização e avaliação de métodos
parasitológicos para diagnóstico da toxoplasmose
em gestantes de risco e seus recém-nascidos
após terapêutica específica

Orientadora:

Dra. Ana Maria de Castro

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Goiânia-GO, 2007.

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

TATIANE LUIZA DA COSTA

Otimização e avaliação de métodos
parasitológicos para diagnóstico da toxoplasmose
em gestantes de risco e seus recém-nascidos
após terapêutica específica

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

Orientadora: Dra. Ana Maria de Castro

Goiânia - GO, 2007.

DEDICATÓRIA

Pequena Parcela

Que eu continue a acreditar no outro, mesmo sabendo de alguns valores tão estranhos que permeiam o mundo!

Que eu continue otimista, mesmo sabendo que o futuro que nos espera nem sempre é tão alegre!

Que eu continue com vontade de viver, mesmo sabendo que a vida é em muitos momentos uma lição difícil de ser aprendida!

Que eu permaneça com a vontade de ter grandes amigos, mesmo sabendo que com as voltas do mundo, eles vão indo embora de nossas vidas!

Que eu realmente sempre tenha a vontade de ajudar pessoas, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, sentir, entender ou utilizar esta ajuda!

Que eu exteriorize a vontade de amar, entendendo que amar não é sentimento de posse. É sentimento de doação!

Que eu sustente a luz e o brilho no olhar, mesmo sabendo que muitas coisas que vejo no mundo escurecem meus olhos!

Que eu retroalimente minha garra, mesmo sabendo que a derrota e a perda são ingredientes tão fortes quanto o sucesso e a alegria!

Que eu atenda sempre mais a intuição que sinaliza o que de mais autêntico possuo!

Que eu pratique sempre mais o sentimento de justiça, mesmo em meio à turbulência dos interesses!

Que eu não perca o meu forte abraço e o distribua sempre; que eu perpetue a beleza e o brilho de ver, mesmo sabendo que as lágrimas também brotam dos meus olhos!

E que eu manifeste o amor por minha família, mesmo sabendo que ela muitas vezes me exige muito para manter sua harmonia!

Que eu acalente a vontade de ser grande, mesmo sabendo que minha parcela de contribuição no mundo é pequena!

E acima de tudo, que eu lembre sempre que todos nós fazemos parte desta maravilhosa teia chamada vida, criada por alguém bem superior a todos nós!

E que as grandes mudanças não ocorrem por grandes feitos de alguns e sim, nas pequenas parcelas cotidianas de todos nós!

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que sou e por tudo que tenho. Por não me permitir perder a fé, por ter me dado força e saúde para chegar até o fim, e pelas belas amizades que conquistei.

À Professora Doutora Ana Maria de Castro, por ter acreditado e depositado confiança em mim aceitando orientar este trabalho. Sou-lhe grata pela oportunidade, por ter me conduzido com imensa tranquilidade e sabedoria e por ter podido conviver com essa pessoa tão abençoada.

Aos clínicos Doutora Mariza Martins Avelino, Doutor Waldemar Naves Amaral e à mestre Maria Bárbara Franco Gomes, pelo fornecimento dos materiais biológicos de seus pacientes para a execução desse trabalho.

Aos Professores Doutores Joana D'arc Herzog, José Clecildo e Marco Túlio Garcia Zapata, pela amizade, otimismo e atenção que despenderam sempre que precisei.

Ao Professor Doutor Ruy Lino Júnior, pelo apoio na realização da pesquisa, através do suporte laboratorial do Departamento de Patologia Clínica.

Ao querido e grande amigo Marcos Gontijo da Silva por me ensinar tudo referente à pesquisa e compartilhar todos os momentos bons e ruins ao meu lado, sempre com muito humor, dedicação e paciência. Que perdure a nossa amizade.

À querida e grande amiga Juliana Boaventura Avelar, pelo grande apoio e estímulo. Obrigada por trilhar este caminho ao meu lado.

À querida amiga Aline, que tanto me ajudou na realização dos exames e principalmente na organização dos arquivos das amostras biológicas.

Aos amigos Diogo e Miriam por terem me auxiliado e por sua amizade ao longo dessa caminhada.

As amigas Josyrene Mariano, Zilma Dourado e Isolina Rodrigues, pela amizade, ajuda e estímulo durante a realização da pesquisa. Espero que nossa amizade continue firme e sincera.

Aos funcionários do IPTSP (Nair, Sueli Meira, Lourdes, Marietta, Vânia) pelo carinho e apoio técnico.

Aos meus pais, por terem estado ao meu lado durante os dois anos de realização deste estudo. Jamais poderei retribuir o seu amor e compreensão.

Ao meu namorado Arthur, que soube compreender a minha ausência. Deu-me força, apoio e segurança em todos os momentos difíceis.

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

A todos aqueles que acreditam em mudanças e participaram direta ou indiretamente na execução dessa pesquisa.

Essa pesquisa contou com o apoio financeiro do Sistema Único de Saúde - SUS através das Secretarias Municipal e Estadual de Saúde do Estado de Goiás, pelo **“Programa de Controle da Transmissão Vertical da Toxoplasmose”**, em ação conjunta da Universidade Federal de Goiás (UFG).

SUMÁRIO

	Página
Resumo-----	VII
Abstract-----	IX
Lista de abreviaturas-----	XI
Lista de Figuras-----	XII
Lista de Tabelas-----	XIII
1. Introdução-----	1
1.1. Apresentação-----	1
1.2. Justificativa-----	1
2. Revisão da Literatura-----	5
2.1. Histórico-----	5
2.2. Etiologia-----	6
2.3. Ciclo Biológico e Mecanismos de Transmissão -----	8
2.4. Epidemiologia-----	12
2.5. Diagnóstico da Toxoplasmose-----	14
2.5.1. Diagnóstico Clínico-----	14
2.5.2. Diagnóstico Laboratorial-----	16
2.5.2.1. Diagnóstico Parasitológico da Toxoplasmose-----	17
2.5.2.2. Perfis e Marcadores sorológicos da toxoplasmose-----	20
2.5.2.3. Diagnóstico Sorológico da Toxoplasmose-----	22
2.5.3. Diagnóstico da Toxoplasmose na Gestante e no Feto-----	27
2.5.4. Diagnóstico da Toxoplasmose no Recém-Nascido-----	29
2.6. Tratamento-----	30
2.6.1. Gestante com Toxoplasmose Aguda-----	32
2.6.2. Criança com Toxoplasmose Congênita-----	33
2.7. Medidas Profiláticas-----	36
3. Objetivos-----	38
3.1. Geral-----	38
3.2. Específicos-----	38
4. Artigos-----	39
5. Considerações Finais-----	79
6. Referências Bibliográficas -----	80
7. Anexos-----	94

RESUMO

A toxoplasmose aguda na gestante é de relevante importância por sua elevada incidência e pelo fato de poder resultar em graves seqüelas para o produto conceptual infectado. Por isso, é de fundamental importância o diagnóstico precoce da infecção fetal, pois a medicação utilizada na gestante e/ou recém-nascido pode mudar o sombrio prognóstico dessa infecção. Embora existam controvérsias na literatura sobre a efetividade clínica do tratamento da toxoplasmose humana, há o respaldo dos resultados favoráveis encontrados nos tratamentos experimentais com a terapêutica.

Por outro lado, existe muita dificuldade no diagnóstico precoce da infecção fetal, devido a vários fatores fisiológicos como imaturidade do sistema imune, dificuldade de formação de anticorpo pelo feto em função dos elevados títulos maternos de IgG que atravessam a barreira placentária e problemas na interpretação da quantificação da IgG. Por isso, os métodos de identificação do parasito tornam-se essenciais no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita. O exame de inoculação em camundongos possui 100% de especificidade, mas a sua sensibilidade é baixa, seu custo é elevado, sua técnica é difícil e necessita de 120 dias para a liberação dos resultados. Um exame que possa identificar a presença do parasito no material biológico analisado, que seja de fácil execução e de resultados mais rápidos, torna-se necessário.

Este estudo teve como objetivo geral a otimização e avaliação do diagnóstico sorológico e parasitológico da toxoplasmose em gestantes de risco e seus recém-nascidos após terapêutica específica. Utilizou-se a reação de imunofluorescência indireta, histopatologia e imunohistoquímica experimental, inoculação em camundongos e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Como objetivos específicos, o estudo da virulência de três estoques de *T. gondii* isolados de grávidas de risco e recém-nascidos com toxoplasmose congênita; comparar a susceptibilidade de camundongos das linhagens BALB/c, BALB/xid e Swiss à infecção pelo *T. gondii*; padronizar a PCR e comparar a sensibilidade entre dois diferentes pares de primers; avaliar o diagnóstico parasitológico (inoculação experimental, histopatologia, imuno-histoquímica e PCR) da toxoplasmose congênita em pacientes de risco após terapêutica específica; também avaliar experimentalmente a transmissão do *T. gondii* pelo aleitamento materno.

Os materiais biológicos provenientes dos fetos foram coletados por cordocentese (sangue fetal) e amniocentese (líquido amniótico) e das grávidas e seus recém nascidos,

sangue periférico e líquido cefalorraquidiano, totalizando 146 amostras que foram encaminhadas dos serviços de referência do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás e do Hospital Materno Infantil. Essas amostras foram inoculadas em camundongos BALB/c, acompanhados por 30 dias, após este período, foram anestesiados, sacrificados e necropsiados, seus encéfalos divididos, parte macerada e repicada em outros camundongos. A sorologia experimental foi realizada através reação de imunofluorescência indireta (IFI) para pesquisa de anticorpos anti- *T. gondii* IgG e IgM. Da outra parte do encéfalo, foram realizados cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina (HE) e em lâminas silanizadas para a realização da imuno-histoquímica através da técnica peroxidase anti-peroxidase (PAP). A PCR foi realizada, em 52 amostras de material biológico de origem, e dos encéfalos dos camundongos dos quais a IFI experimental apresentou algum título.

As curvas de sobrevivência dos isolados de sangue periférico de recém-nascido (I-3), líquido amniótico (I-15) e sangue fetal (I-20), apresentaram comportamento semelhante ao da cepa controle RH. São altamente virulentos, ou seja, apresentam alta mortalidade mesmo com baixas concentrações de parasitos. A linhagem de camundongos BALB/c mostrou-se mais susceptível à infecção pelo *T. gondii* que as linhagens BALB/xid e Swiss que demonstraram maior resistência. Baseado nos resultados de PCR negativos houve a necessidade de testar a viabilidade e sensibilidade dos primers utilizados, observados assim que os primers T1-T2 são mais sensíveis que B5-B6, para detecção de *T. gondii*, apresentando uma alta sensibilidade (83 a 100%) nas amostras analisadas, incluindo sangue.

A histopatologia, imunohistoquímica e PCR não demonstraram a presença do parasito em tecidos e líquidos biológicos. Apesar de obter títulos iguais ou inferiores a 1:40 na IFI, não os consideramos positivos por não ter comprovação pelos métodos parasitológicos utilizados.

A transmissão experimental do *T. gondii* mostrou o leite materno como uma importante fonte de infecção na fase aguda da doença, em camundongos BALB/c.

Os métodos de diagnósticos parasitológicos apresentaram-se negativos. Acredita-se que estejam correlacionados ao tratamento prévio dos pacientes e/ou à baixa virulência das cepas, validando assim o tratamento específico dos pacientes de risco.

ABSTRACT

Acute toxoplasmosis in pregnant women has great importance due to its high incidence and due to the fact that it can result in severe sequelae to the infected concept. Therefore it is of fundamental importance the precocious diagnosis of fetal infection as the medication used in the pregnant woman and/or in the newly born can change the dark prognosis of this infection. However there are difficulties in the obtaining of secure deductions surrounding the clinical effectiveness of the treatment of human toxoplasmosis there is the stability of favorable results found in experimental therapeutic treatments.

In the other hand, there are great difficulties in the precocious diagnosis of fetal infection due to several physiologic factors such as immune system immaturity, difficulties in antibodies synthesis by the fetus because of the elevated titers of maternal IgG which can pass through the placental barrier, and problems in the interpretation of IgG quantification. That is why that the parasite's identification methods become essential in the precocious diagnosis of congenital toxoplasmosis. The mice inoculation exams have 100% specificity in spite of its low sensibility, high cost and the technique is difficult and requires 120 days until results release. Therefore, an exam that can identify the parasite's presence in the analyzed biological material, with simpler execution and quicker results release is necessary.

This study had as a general objective the optimization and validation of serological and parasitological diagnosis of toxoplasmosis in suspected pregnant women and its newly-born after the specific treatment, through the use of indirect immunofluorescence, histopathology, experimental immunohistochemistry, mice inoculation and polimerasis chain reaction (PCR). As specific objectives: the virulence study of three stock strains of *T. gondii* obtained from suspected pregnant women and newly-born with congenital infection; to compare the susceptibility of mice from different strains such as BALB/c, BALB/xid and Swiss to *T. gondii* infection; standardization of PCR technique and comparison of sensibility from two different pairs of primers. Also the objective was to evaluate the experimental transmission of *T. gondii* through breastfeeding.

The biological materials from fetuses were collected by cordocentesis (fetal blood) and amniocentesis (amniotic fluid) and from pregnant women and their newly born, peripheral blood and cerebrospinal fluid, resulting in a total of 146 samples from the references services from the Hospital das Clínicas from Federal University of Goias and from Materno Infantil Hospital. The samples were inoculated in BALB/c mice, followed up

for 30 days and after this period they were anesthetized, euthanized and autopsied. Their encephala were divided, part of them were macerated and introduced in other mice. The experimental serology was performed through indirect immunofluorescence (IFI) aiming the search for anti-*T. gondii* IgG and IgM antibodies. From the other part of the encephala, histological layers were performed, stained by haematoxylin-eosin and in other silanized the immunohistochemistry was performed through peroxidasis-anti-peroxidasis (PAP). The PCR technique was performed in 52 samples from the original viological material and in the mice encephala that presented any titer in the experimental IFI.

The isolated survival curves from the newly-born peripheral blood (I-3), amniotic fluid (I-15) and fetal blood (I-20) presented similar behavior to the RH control strain. They are highly virulent; in other words, present high mortality rates even with low parasites concentrations. BALB/c mice lineage is more susceptible to toxoplasmosis than BALB/xid and Swiss ones, which demonstrated greater resistance. Based upon the negative PCR results, it was necessary to test the viability and sensibility of the used primers. We observed that T1-T2 primers are more sensible than B5-B6 ones towards *T. gondii* detection presenting high sensibility (83-100%) in the analyzed samples, including blood.

The histopathology, immunohistochemistry and PCR techniques did not demonstrate the parasite's presence in tissues nor in biological fluids. In spite of titers equal or lower than 1:40 in IFI technique, the samples were considered negative due to lack of confirmation from parasitological techniques.

The experimental transmission of *T. gondii* through breastfeeding showed it as an important source of infection acute phase in BALB/c mices.

The parasitological diagnostic methods resulted negative. This result is believed to be related to the previous treatment of patients and/or due to low virulence of strains, which validate the specific treatment of suspected patients.

LISTA DE ABREVIATURAS

CN – Controle Negativo

DNA – *Desoxiribonucleic Acid*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

HC/UFG – Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás.

HE - Hematoxilina Eosina

HP - Histopatologia

IFI – Imunofluorescência Indireta

IgA – **Imunoglobulina A**

IgE – **Imunoglobulina E**

IgG – **Imunoglobulina G**

IgM – **Imunoglobulina M**

IH – Imuno-histoquímica

INOC – Inóculo

IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

I-3 – Isolado 3

I-15 – Isolado 15

I-20- Isolado 20

LA – Líquido Amniótico

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

PAP – Peroxidase Anti-peroxidase

PBS – *Phosphate Buffer Solution*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RN – Recém Nascido

rpm – Rotações por Minuto

SgF – Sangue Fetal

SgM- Sangue Materno

SgRN – Sangue de Recém Nascido

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii*-----Pág. 11

Figura 2 - Perfis Sorológicos da Toxoplasmose-----Pág. 13

Figura 1 - Curvas de sobrevivência em camundongos BALB/c de três isolados de grávidas de risco e recém-nascidos com toxoplasmose congênita-----Pág. 46

Figura 2 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando a sensibilidade dos primers B5-B6 em lavado peritoneal de camundongos--- -----Pág. 48

Figura 3 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando a sensibilidade dos primers T1-T2 em lavado peritoneal de camundongos -----Pág. 48

Figura 4 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando a sensibilidade dos primers T1-T2 em sangue de camundongos-----Pág. 48

Figura 5 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando a sensibilidade dos primers B5-B6 em sangue de camundongos-----Pág. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais manifestações clínicas da Toxoplasmose congênita-----Pág. 12

Tabela 1 – Susceptibilidade entre diferentes linhagens de camundongos-----Pág. 47

Tabela 1 – Resultados dos exames realizados em material de origem humana-----Pág. 62

Tabela 2 – Resultados dos exames realizados em material de origem experimental--Pág. 63

Tabela 1 – Distribuição da sobrevivência de 24 filhotes sob risco de infecção oral pelo
Toxoplasma gondii-----Pág. 75

1- INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

No Estado de Goiás existe o Programa de Proteção à Gestante, onde se realiza “screening” sorológico para infecções que podem ser transmitidas verticalmente (toxoplasmose, sífilis, chagas, rubéola, síndrome da imunodeficiência humana, hepatite B e C, HTLV, citomegalovírus). As mulheres identificadas como de risco (no caso da toxoplasmose, com infecção aguda) são encaminhadas ao Hospital das Clínicas/UFG, que é um centro de referência para estas infecções (para o Estado e Município), com o acompanhamento das gestantes e de seus filhos.

Por isso, no contato diário com pacientes hospitalizados foi observada uma frequência elevada entre os recém-nascidos de infecções congênitas do grupo TORCHS (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes e sífilis). Pela grande quantidade de sorologia positiva e inconclusiva para toxoplasmose entre os filhos das mulheres que tiveram toxoplasmose aguda, surgiu a necessidade de confirmação da doença com maior rapidez e concisão para a decisão correta de se instituir ou manter uma terapêutica apropriada.

Assim, após estágio no laboratório de Protozoologia, foi dada continuidade na linha de pesquisa “diagnóstico parasitológico da toxoplasmose em gestantes e recém-nascidos” através dos seguintes métodos: Inoculação em camundongos, testes sorológicos no sangue de camundongos inoculados com material biológico (sangue, líquido amniótico e LCR), histopatologia, imunohistoquímica e PCR.

1.2 JUSTIFICATIVA

Avaliações epidemiológicas mostram que a infecção pelo *Toxoplasma gondii* encontra-se disseminada no mundo, com incidência variável nas diferentes regiões do planeta. Algumas regiões apresentam baixa prevalência da toxoplasmose, nessas localidades, a toxoplasmose congênita não constitui problema de saúde pública, como nas regiões de elevada prevalência (Ferreira, 2001). No Brasil, os diversos inquéritos epidemiológicos realizados em gestantes com diferentes testes sorológicos têm mostrado uma alta prevalência da toxoplasmose, que varia de 55% a 70%. Infere-se que de 30% a 45% das mulheres em

idade fértil não apresentam anticorpos específicos para a doença com risco de contraí-la na gestação e transmiti-la ao concepto. Em Goiânia, a taxa de prevalência da infecção tem se mantido estável nos últimos 23 anos (Avelino, 2000). Philocreon (1976) descreveu uma positividade sorológica de 63,45% entre gestantes e Avelino (2000) mostrou uma positividade de 65,8% entre mulheres em idade fértil.

A toxoplasmose congênita pode ser prevenida durante a gestação através de um acompanhamento pré-natal adequado e do diagnóstico precoce da infecção materna pelo *T. gondii*. Essa é de relevante importância em nosso meio, pela elevada incidência de 8,9% (Avelino et al. 2003).

O diagnóstico precoce assim como o tratamento antiparasitário adequado da mãe tem demonstrado ser capaz de reduzir a taxa de transmissão para o feto e também a gravidade das seqüelas nos casos em que a infecção intra-uterina já ocorreu (Hohlfeld et al. 1990; Foulon et al. 1994). A taxa de transmissão materno-fetal varia principalmente de acordo com a idade gestacional no momento da infecção materna. Quando essa ocorre antes da décima quinta semana de gestação, pode resultar numa taxa de transmissão menor do que 5% podendo atingir 80% se próximo do termo (Foulon et al. 1999), mas o acompanhamento sorológico materno sistemático durante a gestação permite apenas uma estimativa indireta do risco de infecção fetal (Remington et al. 1995).

A transmissão transplacentária é significativa porque o feto é um organismo frágil do ponto de vista imune, tanto nos mecanismos de defesa inespecíficos quanto nos específicos. A transmissão passiva de IgG da mãe para proteger o filho só atinge níveis eficazes após a 20-22ª semanas de gestação, o que faz com que as repercussões fetais variem em gravidade e dependam do grau da deficiência imunológica. Consequentemente, os acometidos intra-útero podem ter manifestações da doença com características de infecção aguda, sub-aguda ou crônica, dependendo da fase da gestação em que a infecção ocorreu (Naspitz, 1985; Ceccon et al. 1997).

A toxoplasmose pode se manifestar clinicamente de diversas maneiras; porém, caracteristicamente, é assintomática ou oligossintomática nos pacientes imunocompetentes. Quando atinge os pacientes imunocomprometidos determina quadros graves e se infecta a gestante, pode ocasionar danos importantes ao concepto. Habitualmente, a toxoplasmose se transmite ao feto durante a primo-infecção materna. Também se descreve a transmissão congênita em filhos de mulheres que tiveram a infecção antes da concepção (Pons et al,

1995). Além disso, a toxoplasmose é indicada como causa de abortamento de repetição (Gomes et al. 1978).

O aspecto clínico da infecção congênita pelo *T. gondii* varia de alterações aparentes ao nascimento, com morbimortalidade perinatal elevada (microcefalia, crescimento intra-uterino retardado, hidrocefalia), a uma infecção subclínica com possibilidade de risco para o desenvolvimento de coriorretinite e/ou complicações tardias na vida futura (Wilson et al. 1980; Koppe et al. 1986; McAuley et al. 1994). Por outro lado, a maturidade é um fator importante de resistência natural contra o parasito, pois geralmente ocorre uma infecção assintomática nas mães gestantes e sintomáticas (ao longo do tempo) nos seus filhos. A fim de providenciar tratamento apropriado para todas as crianças com risco de infecção congênita pelo *T. gondii*, o diagnóstico definitivo da infecção congênita é obrigatório e deve ser prontamente realizado (Remington et al. 1995; Lebech et al. 1996).

Classicamente, o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose tem se baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasito. Segundo as características imunoquímicas destes anticorpos, diferentes marcadores sorológicos têm sido descritos para distinguir entre infecção latente, comum na população, e infecção recente ou toxoplasmose-doença. Outras respostas também se esperam da sorologia da toxoplasmose, como datar na gestante seu contágio pelo parasito ou, no imunodeficiente a reagudização de uma toxoplasmose latente. Para tais interrogações, a sorologia da toxoplasmose apresenta-se muito complexa, mas em contínua evolução (Ferreira, 2001). As técnicas sorológicas utilizadas na rotina laboratorial têm sensibilidade satisfatória em grávidas (Denmark & Chessum, 1978; Sounis, 1979; Camargo, 1995). Um fator preocupante é que em fetos e recém nascidos essas técnicas são imprecisas devido à imaturidade imunológica do feto e/ou recém-nascidos (RN). As interferências de anticorpos de classe IgG de origem transplacentária que interferem na produção de anticorpos fetais e dificuldades na interpretação da quantificação da IgG (pela confusão com a IgG materna) tornam necessárias técnicas parasitológicas que evidenciem com precisão a transmissão congênita (Avelino et al. 2003).

A evidenciação do parasito por isolamento a partir de material biológico, ou pela demonstração de seus componentes, como antígenos ou segmentos do DNA, é de alto valor diagnóstico. A inoculação em camundongos é uma prática laboratorial largamente utilizada como complemento ao diagnóstico sorológico em fetos e RNs, porém apesar de 100% de especificidade possui baixa sensibilidade e necessita de longo tempo para a resposta

laboratorial desejada, além de necessitar de acompanhamento técnico e um grande número de animais em cada experimento.

Por esse motivo torna-se necessária a análise de outros métodos, que permitam determinar a presença da infecção protozoótica em camundongos infectados por materiais biológicos oriundo de fetos e/ou de recém-nascidos. Essas dificuldades motivaram esse estudo. A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica com boa sensibilidade e especificidade, porém seu uso ainda não está disponível na rotina.

A identificação de uma possível correlação entre a severidade da doença, o tipo de cepa isolada do material biológico e a análise de seu comportamento pode ter elevada importância para a determinação de um tratamento correto.

Baseado nestes dados, este trabalho torna-se importante para avaliar experimentalmente o estudo da virulência, patogenia e tropismos dos estoques de *T. gondii* isolados de fetos e recém-nascidos.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O *T. gondii*, agente responsável pela toxoplasmose, foi reconhecido provavelmente pela primeira vez no Brasil, em São Paulo, por Alfonso Splendore em julho de 1908 (Rey, 1991). Este pesquisador de origem italiana e radicado no Brasil, ao trabalhar com coelhos em seu laboratório, observou uma doença cujo quadro anatomopatológico era semelhante à leishmaniose visceral humana. Apresentou uma descrição completa das lesões patológicas e dos corpúsculos parasitários presentes na forma livre e intracelular, isolados e agrupados, em diversos tecidos de animais infectados. Em 26 de outubro de 1908, Nicolle e Manceaux do Instituto Pasteur de Tunis descreveram um microrganismo semelhante àquele observado por Splendore, em células monocelulares do baço e do fígado de um roedor norte-africano, o *Ctenodactylus gondii* (Neves, 2001).

Nos Estados Unidos da América, Wolf & Cowen (1939) foram os primeiros autores a descreverem a infecção congênita no homem relatando a ocorrência de toxoplasmose fatal em recém-nascido com encefalite, meningite e mielite, embora com alguns erros de classificação posteriormente corrigidos. Comunicaram a existência do *T. gondii* em lesão do sistema nervoso central de uma criança falecida com um mês de vida. Também realizaram a primeira transmissão experimental de toxoplasmose humana para animais, tendo ainda demonstrado um agente infeccioso produzindo doença intra-uterina. A descoberta do *T. gondii*, como causa de doença adquirida no adulto, é creditada a Pinkerton & Weinman (1940), que descreveram um caso de doença fatal generalizada em um jovem.

O grande avanço na epidemiologia da infecção, no entanto, só foi possível após a descoberta do teste sorológico que identifica a presença de anticorpos específicos no sangue dos animais infectados, o teste de Sabin & Feldman (1948) ou teste do corante, que muito contribuiu, através de inquéritos epidemiológicos para o reconhecimento do parasito como causa de infecção e doença em humanos.

Hutchinson (1965) foi o primeiro a reconhecer o papel do gato no ciclo evolutivo do parasito, mostrando que esses animais poderiam eliminá-lo pelas fezes. A verdadeira natureza do parasito permaneceu um mistério até que Frenkel et al. (1970) estabeleceram

que o parasito é um protozoário Coccídeo, que tem por hospedeiro definitivo o gato e existe em dois ciclos distintos: enteroepitelial em gatos e extraintestinal em tecidos de outros hospedeiros inclusive os felídeos. Hutchinson et al. (1970) descreveram o oocisto como forma infectante do parasito.

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

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

2.2 ETIOLOGIA

T. gondii é um protozoário do filo Apicomplexa, pertencente à família *Sarcocystidae*, da classe *Sporozoa*, subclasse *Coccidia*, subordem *Eimereina*. Apresenta-se na natureza sob três formas: - **Oocisto**, responsável pela produção de esporozoítos; - **Taquizoíta** ou a forma proliferativa; - **Bradizoíta** denominado a forma cística (Dubey, 1998).

Essas três formas apresentam organelas citoplasmáticas características do Filo Apicomplexa (visíveis apenas a nível de microscopia eletrônica de transmissão) que constituem o complexo apical: Conóide, anel polar (em número de dois), microtúbulos subpeliculares, roptrias, micronemas e grânulos densos. A invasão dessas formas na célula hospedeira envolve a exocitose sucessiva das organelas, micronemas, roptrias e grânulos densos. Sugere-se que essa invasão seja realizada em três etapas sucessivas: Micronemas - agiriam no reconhecimento e na adesão inicial do parasito aos receptores da superfície adequada da célula hospedeira; Roptrias - agiriam na invasão propriamente dita que seria a internalização do zoíto dentro do vacúolo parasitóforo recém-formado; Grânulos densos - estariam envolvidos na remodelação do vacúolo parasitóforo como um compartimento metabolicamente ativo para o crescimento do parasito. Recentemente, foi descrita mais uma organela denominada apicoplasto, localizada no citoplasma dos zoítos, próxima ao núcleo,

caracterizada pela presença de quatro membranas. Sua origem parece ter ocorrido através da endossimbiose secundária de algas verdes. Essa organela parece essencial à sobrevivência intracelular do parasito e há evidências de exercer função de biossíntese de aminoácidos e de ácidos graxos (Neves, 1994).

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

O taquizoíto é a forma encontrada durante a fase aguda da infecção, sendo também denominada forma proliferativa, forma livre ou trofozoíto. Foi a primeira forma descrita e o seu aspecto morfológico, em forma de arco (toxon = arco), deu o nome ao gênero. Essa forma requer um habitat intracelular para se multiplicar e sobreviver, sendo rapidamente destruída no suco gástrico (Jacobs et al. 1960). Sua reprodução dentro das células do hospedeiro ocorre por endodigenia, um processo de brotamento interno em que duas células-filhas são formadas dentro da célula-mãe, sendo então liberadas após ruptura. A forma de taquizoíto é encontrada no estágio agudo da infecção, invadindo todos os tipos de células. Após a invasão das células do hospedeiro, os microrganismos se multiplicam rapidamente nos seus vacúolos, formando rosetas. O citoplasma torna-se repleto de taquizoítos a ponto de se romper e provocar a liberação destes, que invadem células contíguas ou são fagocitados (Amato & Marchi, 2002).

A forma de resistência do *T. gondii* nos tecidos é o cisto contendo bradizoítos, que pode permanecer viável pelo resto da vida do hospedeiro (Dubey & Frenkel, 1976). Os bradizoítos podem estar presentes em todos os tecidos, porém, os principais sítios de

infecção latente ocorrem no miocárdio, cérebro e tecido músculo-esquelético (Remington & Cavanaugh, 1965). A parede do cisto pode ser rompida por causa da pepsina ou da tripsina, sendo que os bradizoítos liberados permanecem viáveis por até duas horas em meio contendo ácido clorídrico e pepsina, ou até seis horas, em meio contendo tripsina, permitindo sobreviverem ao período de digestão normal do estômago e no duodeno. O congelamento abaixo de 20°C negativos e o aquecimento acima de 66°C destrói a forma cística do parasito, entretanto em temperatura de 4°C, este pode sobreviver por até dois meses (Jacobs et al. 1960). Um aspecto importante do cisto é uma possível reativação da infecção, causada pela liberação de bradizoítos, que se transformam em taquizoítos e promovem uma nova infecção aguda local (Frenkel et al. 1975).

2.3 CICLO BIOLÓGICO E MECANISMOS DE TRANSMISSÃO

O ciclo biológico do *T. gondii* é do tipo heteroxeno, pois ocorre em duas fases distintas. Uma fase se passa no hospedeiro definitivo, conforme definido por Frenkel et al. (1970) e não é apenas o gato, mas sim os felídeos em geral. A outra fase acontece no hospedeiro intermediário que pode ser o homem, outros mamíferos e as aves. A figura 1 mostra as duas fases do ciclo biológico do *T. gondii* (Neves, 2001).

O ciclo no hospedeiro definitivo (gatos e felídeos jovens) ocorre somente nas células epiteliais, principalmente do intestino delgado. Durante o desenvolvimento desse ciclo ocorre uma fase assexuada (merogonia) e outra sexuada (gamogonia) do parasito. Deste modo, um gato jovem e não imune, infectando-se oralmente por oocistos, cistos ou taquizoítos, desenvolverá o ciclo sexuada (Rey, 1991). Os esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítos, ao penetrarem no epitélio intestinal do gato, sofrerão um processo de multiplicação por endodiogenia e merogonia, dando origem a vários merozoítos. O conjunto desses merozoítos formados dentro do vacúolo parasitóforo da célula é denominado meronte ou esquizonte maduro. O rompimento da célula parasitada libera os merozoítos que penetrarão em novas células epiteliais e se transformarão nas formas sexuadas masculinas ou femininas: os gametócitos ou gamontes, que, após um processo de maturação, formarão os gametas masculinos (microgametas) e os gametas femininos (macrogametas). O macrogameta (imóvel) permanecerá dentro de uma célula epitelial, enquanto os microgametas (móveis e flagelados) sairão de sua célula e irão

fecundar o macrogameta, formando o ovo ou zigoto. Este evoluirá dentro do epitélio formando uma parede externa dupla, dando origem ao oocisto. A célula epitelial sofrerá rompimento em alguns dias, liberando o oocisto ainda imaturo. Esta forma alcançará o meio externo juntamente com as fezes onde sofrerá um processo de maturação denominado esporogonia após um período de cerca de quatro dias, e apresentará dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada. O gato jovem e infectado é capaz de eliminar oocistos durante um mês, aproximadamente. O oocisto, em condições de umidade, temperatura e local sombreado favorável, é capaz de se manter infectante por cerca de 12 a 18 meses (Kawazoe, 2002).

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

O hospedeiro intermediário (homem, por exemplo) se infecta por via oral, através de transfusão sangüínea, transplante de órgãos, transmissão acidental por auto-inoculação em laboratório e por transmissão transplacentária. A infecção por via oral pode ocorrer através de: ingestão de oocistos presentes em jardins, caixas de areia, latas de lixo ou alimentos contaminados; ingestão de cistos contendo bradizoítos, encontrados em carne crua ou mal cozidos; ingestão de taquizoítos em leite contaminado. As formas de taquizoítos que chegam ao estômago serão destruídas, mas as que penetram na mucosa oral poderão evoluir do mesmo modo que os cistos e oocistos. Cada taquizoíto, esporozoíto ou bradizoíto sofrerá intensa multiplicação, após rápida passagem pelo epitélio intestinal e penetrará em vários tipos de célula do organismo, formando um vacúolo citoplasmático (vacúolo parasitóforo). Neste sofrerão divisões sucessivas por endodiogenia, formando novos taquizoítos (fase proliferativa), que irão romper a célula parasitada, liberando novos taquizoítos, que invadirão novas células. Essa disseminação do parasito no organismo ocorre através de taquizoítos livres na linfa ou no sangue circulante, que poderão provocar um quadro polissintomático, cuja gravidade dependerá da quantidade de formas infectantes adquiridas, cepas do parasito e da suscetibilidade do hospedeiro. Essa fase inicial da infecção – fase proliferativa – caracteriza a fase aguda da doença. Neste ponto, a evolução poderá ir até a morte do hospedeiro, o que poderá ocorrer em fetos ou em indivíduos com comprometimento imunológico, ou diminuir e cessar pelo aparecimento de resposta imune específica. Com o aparecimento da imunidade, os parasitos extracelulares desaparecem do

sangue, da linfa e dos órgãos viscerais, ocorrendo uma diminuição intracelular (Amato & Marchi, 2002).

Alguns taquizoítos, no entanto, invadem as células, desenvolvem, após proliferações iniciais, uma cápsula cística na parede do vacúolo parasitóforo, diminuindo seu metabolismo e transformando-se em uma forma de metabolismo mais baixo, os bradizoítos, que pela constante resposta imunológica permanecem no interior do cisto sem despertar sintomatologia significativa do hospedeiro por meses, anos e provavelmente décadas (Dubey & Frenkel, 1976). A resposta imunológica limita a progressão da infecção e o desenvolvimento de novas lesões, porém não erradicam os cistos já existentes encontrados em múltiplos órgãos, sendo formas de resistência do parasito. Estes cistos ocasionalmente se rompem liberando os bradizoítos, que podem evoluir para taquizoítos e reinfetar células vizinhas, despertando reação inflamatória, com rápido controle pelo sistema imune. Caso o hospedeiro esteja com a resposta imune comprometida, o bloqueio imune dessa proliferação pode não ser eficiente, desenvolvendo-se um processo localizado de toxoplasmose (Kawazoe, 2002).

Outra possibilidade é a transmissão congênita, que ocorre no período gestacional principalmente durante a infecção aguda. Fora desse período, tem sido descrita em gestações sucessivas e em gestantes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), que já tiveram toxoplasmose em alguma fase de sua vida e que estão com uma depressão imune grave (Garcia, 1979; Bearman et al. 1996). As vias de infecção para o feto são: **Transplacentária** – quando a gestante adquire a toxoplasmose durante a gestação e, apresenta a fase aguda da doença, poderá transmitir *T. gondii* ao feto, sendo provavelmente os taquizoítos como formas responsáveis; **Rompimento de cistos no endométrio** – apesar de a gestante apresentar a doença na fase crônica, alguns cistos localizados no endométrio poderiam se romper (distensão mecânica ou ação lítica das vilosidades coriônicas da placenta), liberando os bradizoítos que penetrariam no feto; **Taquizoítos livres no líquido amniótico** – os taquizoítos presentes no líquido amniótico atingiriam o feto (Neves, 2001). Isso ocorre após um período de tempo variável, que depende da agressividade da cepa, do número de organismos que invadiram a placenta, da resposta imune do organismo invadido e da intensidade dessa resposta inflamatória do feto. Por outro lado, a resposta imune do feto é imatura e depende da idade gestacional do conceito. A tabela 1 mostra as manifestações clínicas da toxoplasmose congênita de acordo com o período gestacional de aquisição da infecção (Montoya & Liesenfeld, 2004).

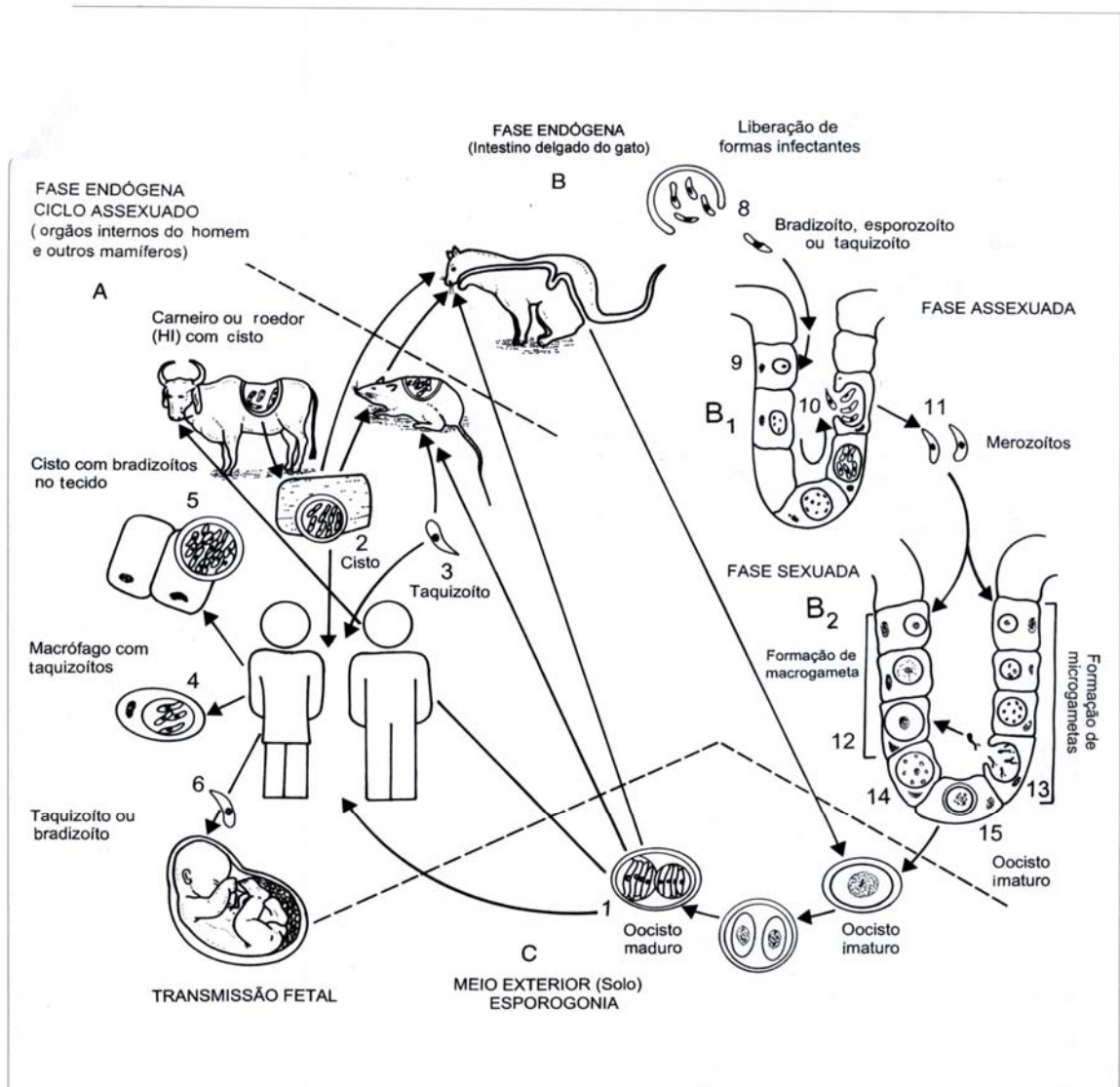


Figura 1. Ciclo Biológico do *T. gondii* (Neves, 2001).

Tabela 1-Principais manifestações clínicas da toxoplasmose congênita (Montoya & Liesenfeld, 2004).

	Período de aquisição da infecção		
	1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre
Toxoplasmose congênita	9%	27%	59%
Subclínica	22%	74%	90%
Clínica	78%	16%	10%
Abortos e natimortos	5%	2%	0%

2.4 EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE

Avaliações epidemiológicas mostram que a infecção encontra-se disseminada no mundo, com incidência variável nas diferentes regiões do planeta. A prevalência da infecção toxoplásmica em adultos varia consideravelmente de acordo com a idade e a população estudada (Feldman & Miller, 1956). Esta variação pode ser explicada pela diferença de exposição às duas principais fontes de infecção: os cistos teciduais presentes na carne de animais, e os oocistos, disponíveis em solo contaminado por fezes de gatos. A maior prevalência da infecção encontrada na França relaciona-se ao freqüente hábito de ingestão de carne crua ou mal cozida (Desmonts et al. 1965). Nos Estados Unidos a prevalência atinge 10% a 50%, enquanto que na Austrália é de 4%, na Finlândia 20%, Polônia 36%, Áustria 37%, Itália 40%, Etiópia 48%, Bélgica 53%, Panamá 63%, França 71% e El Salvador 75% (McCabe & Remington, 1988; Aspöck & Pollack, 1992; Roos et al. 1993).

Considerando-se que a toxoplasmose congênita é sintomática em apenas 10% dos pacientes, torna-se muito difícil determinar sua real incidência em países que não realizam o acompanhamento sorológico sistemático durante a gestação (Hall, 1992). Ela difere entre as várias populações, sendo estimada uma incidência de um a sete infectados para cada 1000 nascidos vivos nas várias regiões do mundo. Em algumas localidades, essa taxa pode ser mais elevada, como 10,9/1000 encontrada na Guatemala (Remington et al. 1995); 17/1000,

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

Na década de sessenta, vários estudos epidemiológicos foram realizados no Brasil. A investigação realizada em Belo Horizonte por Araújo (1970) em soros de 729 adultos revelou 50% de positividade à reação Sabin-Feldman. No final da década de oitenta, Vaz et al. (1990) encontraram em 481 gestantes, ao primeiro atendimento em centro de saúde da área metropolitana de São Paulo, soropositividade de 67%. Já na década de noventa, várias investigações foram publicadas. Na cidade de Porto Alegre, estudo coordenado por Neves et al. (1994), em 812 gestantes, encontrou positividade para toxoplasmose de 54%. Estudo coordenado por Pedreira (1995), através de triagem sorológica para toxoplasmose em 2.330 gestantes por ocasião da primeira consulta pré-natal em Hospital Universitário de referência do município de São Paulo, constatou a prevalência de anticorpos específicos para toxoplasmose em 65% de 175 gestantes. Em Belém, estudo feito no Instituto Evandro Chagas por Carmo et al. (1997) em um grupo de 192 grávidas, revelou que 71% eram soropositivas. Outra pesquisa realizada por Brisighelli Neto (1998) em 397 gestantes, na cidade de Bragança Paulista no Estado de São Paulo, constatou soroprevalência de 55%. Nóbrega (1998), em Recife, ao estudar 1.309 grávidas, encontrou o valor de 69%. Bichara (2001), em estudo desenvolvido no ambulatório do Programa de Toxoplasmose do Instituto Evandro Chagas com 656 gestantes procedentes da área metropolitana de Belém, detectou prevalência de 81%. Spalding et al. (2003) encontrou soropositividade para IgG em 74,5% e para IgM em 3,6% das 2.126 gestantes que realizaram sorologia nas Unidades do Sistema Único de Saúde da região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Outro estudo realizado por Varella et al. (2003) revelou uma prevalência de 59,8% em 1.261 gestantes atendidas na Maternidade do Hospital Nossa Senhora da Conceição de Porto Alegre (RS).

Em Goiânia, a taxa de prevalência da infecção tem se mantido estável nos últimos 23 anos. Philocreon (1976) descreveu uma positividade sorológica de 63,45% entre gestantes e Avelino (2000) mostrou 65,8% entre mulheres em idade procriativa.

2.5 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

2.5.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Os sintomas da toxoplasmose aguda em gestantes podem ser transitórios e inespecíficos. Quando estão presentes, no máximo em 10% dos casos, geralmente limitam-se a linfadenopatia e à fadiga. A linfadenopatia pode persistir durante meses e comprometer apenas um único linfonodo. Menos freqüentemente, tem sido descrita uma síndrome do tipo mononucleose caracterizada por febre, mal-estar, faringite, cefaléia, mialgia e linfocitose atípica (Wong & Remington, 1994).

A forma mais comum da protozoose quando adquirida na vida extra-uterina por organismo imunocompetente, é a ganglionar, que corresponde a processo febril com adenopatias e comum hepatoesplenomegalia. Contudo, trata-se de infecção pleomorfa, podendo causar, em indivíduos imunodeprimidos, encefalite, mielite, miocardite, pneumonia intersticial e outros comprometimentos (Amato & Marchi, 2002).

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

A infecção que se manifesta no período neonatal é caracterizada pela tríade clássica de Sabin, composta por alterações do volume craniano (hidrocefalia ou microcefalia), coriorretinite (geralmente bilateral, macular ou perimacular, simétrica), calcificações intracranianas e retardamento mental. É conveniente ainda referir que, em alguns recém-nascidos gravemente acometidos, desenvolvem-se manifestações hemorrágicas de vários tipos, além de outras manifestações menos citadas, como nistagmo, estrabismo, microftalmia, pneumonia intersticial, miocardite, envolvimento de supra-renais, hipertrofia

de linfonodos, alterações endócrinas e gastrointestinais, com repercussões traduzidas por mixedema, diabetes insípido e puberdade precoce (Veronesi, 1982).

A grande maioria dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita tem doença subclínica ao nascer. Contudo, estes recém-nascidos podem apresentar anormalidades da retina e do sistema nervoso central quando são submetidos a exames especializados, ou podem apresentá-las no decorrer do seu desenvolvimento (Wilson et al. 1980; Guerina et al. 1994). A concreta possibilidade de crianças congênitamente infectadas não exibirem distúrbios detectáveis clinicamente ou através de exames subsidiários em fase inicial da vida, constitui condição que merece conveniente atenção. A toxoplasmose congênita pode permanecer latente por vários anos e, não excepcionalmente, durante a puberdade (talvez por influência hormonal) ou mais adiante, reativar. Os distúrbios oculares e neurológicos são exemplos comuns observados neste tipo de reativação clínica (Amato & Marchi, 2002).

O diagnóstico clínico da toxoplasmose congênita é, por vezes, impreciso, pois as manifestações clínicas podem ser confundidas com as causadas por outros agentes como o Citomegalovírus, Herpes simples, Rubéola, HIV, Epstein Barr, *Treponema pallidum*, *Listeria monocytogenes*, *Borrelia burgdorferi* e *Trypanosoma cruzi*. Outras doenças também podem apresentar sinais clínicos semelhantes à toxoplasmose como a eritroblastose fetal e determinadas doenças degenerativas (Sáfadi, 2000). O exame clínico apenas sugere a eventualidade dessa etiologia, mesmo na toxoplasmose sintomática, ficando a sua confirmação a cargo de exames laboratoriais que identifiquem o parasito ou a presença de anticorpos específicos (Rey, 1991).

Com relação à toxoplasmose ocular podem-se identificar duas formas distintas: a congênita e a adquirida. Em ambas, o acometimento pode ser precoce ou tardio, podendo em alguns casos, manifestar-se clinicamente pela primeira vez, anos depois da infecção sistêmica (de Vroede et al. 1979). A identificação de retinocoroidite pela fundoscopia ocular é muito freqüente, mesmo nos casos sem outros sintomas, e permite realizar o diagnóstico presuntivo de infecção congênita. Contudo, a doença é comumente confirmada através de testes sorológicos, devido à dificuldade de se fazer o diagnóstico clínico ou parasitológico. As dificuldades aparecem porque a retinocoroidite pode ser causada por mais de quinze doenças infecciosas oculares, como sífilis e herpes, mas a toxoplasmose se constitui em principal suspeita (Amato & Marchi, 2002).

Em imunodeprimidos, as manifestações clínicas citadas são encontradas com freqüência. Talvez pela reativação das formas latentes dos cistos contendo bradizoítos nos

diferentes órgãos, revelando ser o *T. gondii* um agente de caráter oportunista. Há de salientar-se que com a extensão da SIDA (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida) ficou claro que a toxoplasmose em pacientes infectados pelo HIV tem como órgão de agressão primária, o sistema nervoso central (Amato et al. 1995).

2.5.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Classicamente, o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose tem se baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasito através de testes sorológicos. Segundo as características desses anticorpos, diferentes marcadores sorológicos, têm sido descritos para distinguir entre infecção latente, comum na população, e infecção recente ou toxoplasmose-doença (Contreras et al. 2000). Outras respostas se esperam, também, da sorologia da toxoplasmose, como datar na gestante seu contágio pelo toxoplasma ou, no paciente imunocomprometido, a reagudização de uma toxoplasmose latente. Por tais interrogações, a sorologia da toxoplasmose apresenta-se como uma das mais complexas, em contínua evolução, exigindo uma variedade de testes e experiência do responsável pela realização e interpretação dos resultados. Entretanto, a evidenciação do parasito, por isolamento a partir do material do paciente, ou pela demonstração de seus componentes, como antígenos ou segmentos do DNA, é de alto valor diagnóstico, especialmente nos imunocomprometidos, seja por imunodepressão ou por imunoimaturidade como no feto e no recém-nascido (Camargo, 2001).

2.5.2.1 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA TOXOPLASMOSE

■ **Inoculação em camundongo** - Utiliza o sangue do paciente, de preferência a camada leucocitária, ou sedimento do centrifugado de líquido cefalorraquiano, líquido amniótico, lavado brônquico-alveolar, suspensões de triturados de biópsia ou de placenta, que são inoculados via intraperitoneal em camundongos isogênicos (Remington et al. 1994). A positividade é indicada pela soroconversão do animal e confirmada pelo achado de taquizoítas no líquido peritoneal ou, mais freqüentemente, de microcistos no cérebro e outros órgãos, evidenciados em cortes de tecido por imunohistoquímica, o que, entretanto, pode exigir passagens “cegas” para novos camundongos, inoculados com triturados de órgãos do primeiro (Camargo, 2001).

Dentre os animais utilizados para o teste, citam-se os hamsters, cobaias, camundongos e coelhos. Desses, os camundongos são os mais susceptíveis à infecção por inoculação peritoneal, podendo fornecer milhões de taquizoítos por microlitro de exsudato em até 3 dias. Uma vez isolada, a cepa de *T. gondii* pode ser mantida para fins experimentais mediante a reinoculação em camundongos (Calvão, 2002). Entretanto, a criopreservação *in vitro* tem sido um método prático para se evitar a perda da cepa e a má utilização de animais. Os taquizoítos podem ser mantidos sem perdas da viabilidade e virulência, entre -20°C e -60°C por oito semanas, a -70°C por 200 dias e em nitrogênio líquido -196°C por tempo indeterminado. Em camundongos há necessidade constante de inoculações que dependem tempo, material e pessoal técnico treinado. A sobrevivência média dos camundongos infectados é curta, entre 4 a 10 dias, ocorrendo acometimento visceral com lesões necróticas, podendo desenvolver cistos teciduais na musculatura e encéfalo. O diagnóstico desta protozoose pode ser realizado pela pesquisa direta de cistos e taquizoítos em tecidos de camundongos, através de cortes histológicos, corados pela Hematoxilina e Eosina (HE), e/ou Imunohistoquímica (IH) (Rosa et al. 2001). Em cortes histológicos corados pela HE pode ser difícil a identificação do *T. gondii*, pois o parasito não possui características tintoriais próprias que permitam distingui-lo nitidamente das células adjacentes, podendo ser confundido com núcleos ou fragmentos nucleares que se coram de forma semelhante (Tsunematsu et al. 1964). Essa técnica, como as demais de pesquisa direta do parasito, exige grande experiência do observador, análise de vários cortes e/ou lâminas, que dificultam a sua utilização na rotina, apesar da boa sensibilidade.

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

■ **Pesquisa de antígenos** – O material antigênico do toxoplasma, bem como complexos imunes parasitários, podem ser detectados no soro na fase aguda da toxoplasmose (Van Knapen et al. 1985). O parasito ou seus antígenos podem ser evidenciados em cortes de tecidos por imuno-histoquímica, utilizando-se anticorpos específicos e coloração imunofluorescente ou imunoenzimática. Métodos de diagnóstico imuno-histoquímico são

específicos e se deram a partir do desenvolvimento do método da peroxidase-antiperoxidase (PAP) (Sternberger et al. 1970). A técnica vem sendo usada no diagnóstico pós-morte de diversos agentes infecciosos, particularmente do *T. gondii* (Davidson et al. 1993; Falangola & Petito, 1993; Brezin et al. 1994; Viotti et al. 1995; Conley et al. 2001). Modificações foram introduzidas e Dubey & Lin (1994), que utilizaram a técnica imunoenzimática da avidina-biotina, para a detecção de cistos do *T. gondii* no cérebro de raposa.

■ **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)** – Durante os últimos 15 anos, o diagnóstico de agentes infecciosos inclui o uso de tecnologia que envolve os ácidos nucléicos. O diagnóstico de organismos parasitários é o último campo da biologia clínica que incorporou essas técnicas, devido aos custos altos dos ensaios de biologia molecular e às baixas prevalências dessas infecções em países que estão na vanguarda da biotecnologia. A presença do parasito pode ser demonstrada através de seus componentes antigênicos ou de segmentos de DNA. Em 1985, a estratégia para se amplificar um alvo genômico mediante a replicação do DNA *in vitro* foi descrita (Saiki et al. 1985). O ensaio da PCR é uma técnica utilizada em testes clínicos para detecção de alterações genéticas ou infecções por diferentes agentes etiológicos (Ellis, 1998). Estudos sobre o genoma do *T. gondii* tornaram possível a utilização da PCR para a detecção do parasito (Bastien, 2002). Amostras de sangue testadas para se investigar parasitemia por ensaios de PCR, amplificando-se segmentos dos genes B1 e P30 de *T. gondii*, mostraram o potencial da técnica para o diagnóstico não-invasivo da toxoplasmose disseminada (Spalding et al. 2003). Diferentes pares de iniciadores para replicação *in vitro* dirigidos a diferentes alvos têm sido utilizados. O primeiro a ser testado e mais amplamente usado é o gene B1, que se encontra repetido em 35 cópias no genoma do parasito. Diversos grupos designaram vários iniciadores que se anelam em diferentes localizações do gene (Pelloux et al. 1996). O gene B1 possui um tamanho de 2,2Kb, foi isolado e descrito por Boothroyd et al. (1988), demonstrando ter uma natureza repetitiva no genoma. Burg et al. (1989) demonstraram a alta sensibilidade da PCR na detecção de apenas um parasito presente no lisado celular usando o gene B1 como alvo de amplificação. Junto a 100 mil células humanas, esses autores conseguiram detectar até um único parasito. Os resultados mostravam a alta especificidade do gene B1 do *T. gondii* e a característica de ser uma região conservada em todas as cepas testadas. Os resultados descritos sugerem que o DNA do parasito pode ser detectado diretamente do creme leucocitário. Recentemente ficou demonstrada a baixa especificidade desse sistema, uma vez que foi evidenciada a co-

amplificação de outras seqüências-alvo nos cromossomos humanos. Não obstante, ainda continua sendo o alvo mais usado no diagnóstico de parasitemia (Kompalic-Cristo, 2004). Wong & Remington (1993) demonstraram que a sensibilidade e a especificidade da PCR amplificando o gene B1 de parasitos presentes no líquido amniótico foi de 100%, em contraste com a inoculação de sangue fetal ou líquido amniótico em camundongos e culturas. A possibilidade de realizar PCR para detectar *T. gondii* em sangue humano, como teste diagnóstico, tem sido descrita (Ho-Yen et al. 1992). Assim, PCR revolucionou o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita, uma vez que limita o uso de métodos invasivos no feto (Remington et al. 2004). Um outro alvo também amplamente usado é o gene P30, que se encontra representado como cópia única codificando para o principal antígeno de superfície do protozoário. Diferentes pares de iniciadores foram igualmente propostos para esse gene (Weiss et al. 1991). Na literatura, protocolos que empregam PCR convencional (qualitativa) para a detecção de genes em cópia única, como o gene P30, parece menos sensível (Buchinder et al. 2003). Outras seqüências-alvo também têm sido utilizadas como: 1) o gene codificante para o RNA da subunidade menor ribossômica, que se encontra repetido em 110 cópias por genoma; 2) um fragmento de 529 pb presente em 200 a 300 cópias por célula; 3) os genes de cópia única codificantes para α e β tubulina; e 4) um aparente segmento repetitivo de DNA não-codificante (TGR1_E) (Bastien, 2002). Estudos demonstram a capacidade da PCR em amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de fluidos corporais diferentes, tais como sangue, líquido amniótico, liquor, humor aquoso, fluido de lavado bronco-alveolar e até urina (Khalifa et al. 1994). Por outro lado, a PCR só será positiva em casos de parasitemia; assim, em casos de toxoplasmose cerebral ou pulmonar, a PCR será de utilidade apenas quando houver disseminação ou passagem do parasito para o sangue, tal como ocorre na etapa aguda dessa parasitose (Khalifa et al. 1994). Nos casos de baixa parasitemia pode ser o método de escolha, permitindo a detecção do parasito e apontando uma interpretação mais exata da etapa de infecção pelo *T. gondii*, indispensável para a prevenção do nascimento de uma criança com toxoplasmose congênita. Nos países nos quais o aborto terapêutico é permitido, abortos desnecessários poderiam ser evitados (James, 1996).

Numerosos ensaios têm sido desenvolvidos, mas nenhum foi suficientemente otimizado e validado com um número grande de indivíduos. Segundo Bastien (2002), o diagnóstico por PCR para a toxoplasmose está longe de ser padronizado e ainda não se tem um consenso que defina as condições do método. Além de outros fatores, a sensibilidade e a

especificidade da PCR dependem não só da seqüência-alvo no DNA do parasito, mas também dos pares de iniciadores de amplificação desenhados. Infelizmente, pouco tem sido publicado para o *Toxoplasma gondii* na literatura nesse sentido. Apesar das raras propostas de PCR para o diagnóstico de toxoplasmose, elas não são consensuais, e mais comparações são necessárias para se conseguir uma melhor padronização. Apesar de todos esses esforços, pergunta-se ainda se o diagnóstico da toxoplasmose utilizando técnicas moleculares de amplificação de DNA é inequívoco. Relatos de pacientes IgM-negativos com PCR positivas estão presentes na literatura, desconfiando-se de falsa positividade ou se considerando parasitemia na fase crônica da doença (Grover et al. 1990). Vários casos de PCR positivas em pacientes assintomáticos são referidos e se desconhece o valor preditivo positivo do teste (Kompalic-Cristo, 2004).

2.5.2.2 PERFIS E MARCADORES SOROLÓGICOS DA TOXOPLASMOSE

As respostas imunes de um hospedeiro à toxoplasmose podem ser natural ou adquirida. Quando um hospedeiro se infecta com o parasito, após a multiplicação na porta de entrada, e segue-se a sua disseminação por todo o organismo através das vias sangüínea e linfática. Durante este período, inicia-se a formação de anticorpos específicos e o desenvolvimento de mecanismos imunecelulares que são responsáveis pela destruição dos taquizoítos extracelulares. Durante a fase crônica da toxoplasmose, somente os bradizoítos ou taquizoítos intracelulares persistem e são responsáveis pela manutenção de títulos sorológicos que podem durar toda a vida do hospedeiro (Kawazoe, 2002).

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

Na evolução da infecção configura-se um perfil sorológico de transição, com níveis elevados de anticorpos IgG, de afinidade crescente pelo antígeno. Estão ausentes os

anticorpos IgA, IgE, podendo os anticorpos IgM ocasionalmente estarem presentes em baixo títulos. Progressivamente, este quadro sorológico dá lugar ao perfil de infecção latente ou crônica, que em geral se mantém por toda a vida, com níveis de IgG em baixos títulos com alta avidéz e ausência dos anticorpos de outros isotipos, ainda que ocasionalmente se encontrem resíduos de IgM. A transição do perfil sorológico de infecção recente para o perfil de infecção latente é mais ou menos lenta, em semanas ou meses, dependendo do estado imunitário dos pacientes, Figura 2 (Camargo et al. 1977).

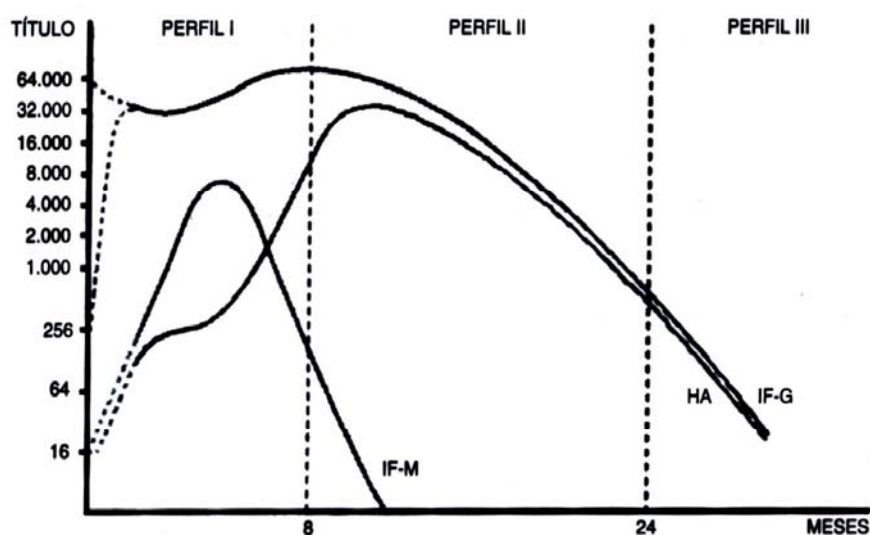


Figura 2. Perfis sorológicos, segundo o comportamento de anticorpos anti-toxoplasma detectados pelos testes de IFI-IgG, IFI-IgM e HA, no curso da infecção pelo *T. gondii* (Ferreira, 2001).

A passagem da IgG específica pela placenta dificulta o diagnóstico da infecção congênita, pois sua presença no sangue do lactente pode refletir a imunoglobulina materna que foi passada via transplacentária durante a gestação como proteção, ou se referir à produzida pelos mecanismos de defesa imune da criança. No entanto, a comparação dos títulos dos anticorpos do binômio “mãe-filho”, pode diferenciar essa situação quando o recém-nascido apresentar níveis de IgG maiores do que os da mãe em no mínimo quatro diluições (Ferreira, 2001). A dificuldade na interpretação dos valores de IgG continua durante o acompanhamento da criança porque o anticorpo de origem materna pode persistir no sangue do lactente por até um ano. Mas a sua persistência em títulos significativos com o

passar dos meses indica produção pela criança porque os níveis oriundos da mãe são decrescentes com o tempo. Após um ano, sua presença no sangue da criança significa que o sistema imune dela foi estimulado pelo *T. gondii*, e, portanto houve infecção (Boyer et al. 1998). Embora a sobrevivência a uma fase aguda resulte em resistência a reinfecção, a imunidade associada com a infecção crônica é somente relatada na natureza. Um número de diferentes investigadores tem relatado que a imunidade prévia para o *T. gondii* em camundongo, causada pela infecção não protege o suficiente para prevenir uma reinfecção. Além disso, camundongos imunizados contra uma cepa de *T. gondii* e subsequentemente inoculados com outra cepa têm ambas as espécies encistadas em seus tecidos. Isso provavelmente ocorre em humanos (Remington et al. 1995).

2.5.2.3 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA TOXOPLASMOSE

A sorologia continua a principal abordagem para estabelecer um diagnóstico de toxoplasmose. Este é baseado na pesquisa de anticorpos de diferentes classes de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA e IgE) anti-*T. gondii*. Além disso, a presença dos anticorpos anti-toxoplasma no curso da infecção permite a análise de perfis sorológicos, seja de infecção recente, em fase aguda, ou de infecção antiga, em fase de latência ou crônica (Contreras et al. 2000). Em indivíduos imunocompetentes os testes sorológicos com pesquisa de IgG e IgM são suficientes para o diagnóstico, por serem sensíveis, específicos e de fácil execução (Camargo, 2001). Porém, para o diagnóstico em adultos imunocomprometidos e na infecção fetal, há necessidade da realização de testes, como os descritos no item anterior. Existem dois tipos principais de testes sorológicos: os que usam organismos inteiros como antígenos e aqueles que utilizam extratos antigênicos de parasitas lisados. Os primeiros são representados pelo teste do corante de Sabin-Feldman, pela Imunofluorescência Indireta e pelo ensaio de aglutinação por imunoabsorção de IgM, que demonstram principalmente anticorpos dirigidos contra os antígenos da membrana do parasita. Os demais que usam o extrato antigênico de parasitas lisados incluem o teste de hemaglutinação passiva e o ensaio imunoenzimático (Duffy et al. 1989).

■ **A Reação de Sabin-Feldman**, também conhecida como teste do corante ou dye test, foi o método sorológico clássico de diagnóstico da toxoplasmose. Sendo a primeira prova de alta sensibilidade desenvolvida, mostrou-se capaz de evidenciar e quantificar, por diluição do

soro, anticorpos "antiparede". Tem como fundamento o fato de que taquizoítos do exsudato peritoneal de camundongos corados pelo azul-de-metileno, em meio alcalino (pH 11), vistos à microscopia óptica apresentam-se com intensa coloração que assumem forma arredondada ovóide, mas, quando incubados em presença do denominado fator acessório, o fenômeno é impedido pela presença de anticorpos específicos no sangue sob análise. Os parasitos extracelulares perdem sua afinidade tintorial, ficando o núcleo corado, o citoplasma incolor e, morfológicamente, mais delgados, falciformes. O resultado corresponde à diluição do soro que impede a coloração. O fator acessório é soro humano sem anticorpos, possuidor de propriedades capazes de tornarem possível a ocorrência do fenômeno básico da reação (Sabin & Feldman, 1948). Esse método é pouco prático no que concerne à realização de inquéritos. Ao ser executado, necessita da elaboração bem recente de preparações indispensáveis, como azul-de-metileno, assim como ter na contagem parasitos corados ou não, etapa realmente difícil e cansativa. Além de todos esses inconvenientes, sofre a influência de critérios de observação variáveis entre diferentes técnicos (Camargo, 2001).

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

■ O teste de **Hemaglutinação Indireta (HAI)** descrito originalmente por Jacobs & Lunde (1957) com hemácias de carneiro recobertas por componentes do parasito, principalmente citoplasmáticos, apresentava baixa sensibilidade. Este teste não detectava IgM ou IgG de baixa avidéz, além de sofrer a interferência de anticorpos heterófilos com conseqüente resultado falso-positivo. Tais falhas foram solucionadas ao se utilizarem hemácias de aves recobertas com antígenos completos do parasito aglutináveis por anticorpos IgG e IgM, tornando o teste altamente sensível. É considerado um teste prático de baixo custo, não exigindo equipamento sofisticado e um bom método para triagem da toxoplasmose. Ocasionalmente, observam-se resultados falso-positivos por interferência de anticorpos IgM

"naturais", aglutininas IgM não-específicas, em geral de títulos baixos. Distingue-se de reações específicas por permanecer com títulos inalterados, enquanto aquelas se elevam em poucos dias na fase aguda da toxoplasmose (Camargo et al. 1989).

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

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

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

■ A introdução do **Ensaio Imunoenzimático (ELISA)** trouxe um grande avanço para o diagnóstico da doença. Camargo et al. (1977) descreveram a técnica para anticorpos IgG e IgM, observando porém, presença de resultados falso-positivos para

IgM em pacientes portadores do fator reumatóide. Desmonts et al. (1981) desenvolveram uma técnica para detecção de IgM, denominada de ELISA duplo sanduíche (DS - ELISA IgM) ou teste de captura de IgM. Através dela foi possível detectar a presença de IgM específica para *T. gondii* em 92% dos indivíduos com toxoplasmose recentemente adquirida, e que eram negativos na reação de Imunofluorescência para IgM.

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

■ A técnica **MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay)** é usada para a determinação quantitativa de anticorpos da classe IgG e IgM antitoxoplasma no soro ou plasma humano. A reação é realizada no analisador de imunoensaio, com acesso randômico e contínuo, AXSYM da Abbott. As amostras usadas para pesquisa dos anticorpos da classe IgM são tratadas com tampão de neutralização do Fator Reumatóide (FR), para remover os anticorpos de interferência (se presentes) do complexo antígeno-anticorpo, a fim de se evitar resultados falsamente positivos. Ao final da reação, o complexo imune ligado ao conjugado marcado com a fosfatase alcalina reage com o substrato 4-Metil Umbeliferil Fosfato (MUP). A fosfatase alcalina cataliza a hidrólise do MUP a MU (Metil Umbeliferil). A quantidade de fluorescência é proporcional à concentração de anticorpos da amostra analisada (Manual de Instruções de Uso AxSYM-Abbott, 2000).

■ No início da década de noventa, foi desenvolvido o teste de **ELISA IgG para avidéz**, que tem se mostrado excelente método de diagnóstico de infecção aguda adquirida. Este método avalia a avidéz de ligação ao antígeno dos anticorpos IgG contra o *T. gondii*, separando os anticorpos de baixa avidéz, produzidos numa fase inicial da infecção, dos anticorpos de alta avidéz, indicativos de infecção crônica (Joynson et al. 1990). A avidéz com que os anticorpos IgG ligam-se a seus respectivos antígenos pode ser avaliada pela maior ou menor

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

■ A reação de **Western blot** tem mostrado que o soro materno e o da criança reconhecem diferentes antígenos do *T. gondii*, quando a criança está congenitamente infectada (Chumptazi et al., 1995). Hofflin & Remington (1985), já tinham reconhecido antígenos diferentes por anticorpos das classes IgG e IgM pela mãe e filho congênitamente infectado. Anticorpos das classes IgM e IgA podem ser identificados contra a principal proteína de superfície do *T. gondii*, a proteína P30, pela técnica de Western blot. Comparando-se a técnica de Western blot com a imunocaptura ELISA, demonstra-se que a primeira tem vantagens sobre a segunda especialmente no diagnóstico da toxoplasmose cerebral dos pacientes com AIDS (Gross et al. 1992). No paciente com HIV e encefalite, o uso dessa reação mostra diversidade antigênica entre diferentes cepas do *T. gondii*.

■ Para a pesquisa de anticorpos **IgA e IgE específicos** para a toxoplasmose, utilizam-se as técnicas imunoenzimáticas, tanto a indireta como a de captura. Embora estas reações estejam sujeitas a alguma discrepância de resultado, pois ainda não estão suficientemente padronizadas, elas vêm assumindo importância crescente como marcadores de infecções recentes inclusive congênicas (Decoster et al. 1992; Wong et al. 1993). A IgA específica pode ser detectada no sangue de adultos e crianças congênitamente infectados, usando ELISA ou ISAGA. Sua sensibilidade é maior na identificação da infecção congênita ou agudamente adquirida (Stepick-Biek et al. 1990). Esse método é importante em sangue do cordão umbilical para evitar a contaminação pelo sangue materno, uma vez que o anticorpo não atravessa a barreira placentária e o seu encontro no feto é diagnóstico de infecção congênita. Os títulos permanecem elevados por um período de 26 semanas, praticamente semelhantes à persistência da IgM (Stepick-Biek et al. 1990). A IgE específica pode ser detectada por Imunoabsorção, podendo também ser usada para o diagnóstico da doença aguda e congênita (Remington et al. 1995). Os componentes desse teste são: anticorpos

monoclonais para IgE humana, amostra do paciente e taquizoítos do *T. gondii* tratados com formalina. Quando os anticorpos IgE específicos anti *T. gondii* estão presentes, ocorre aglutinação visivelmente detectada. Por esse método, podem ser testados soro, sangue fetal, fluido cerebrospinal e fluido amniótico. A persistência do anticorpo específico no sangue materno é detectada até por quatro meses nas pesquisas realizadas, tornando esse método mais seguro do que o da determinação da IgM no diagnóstico da infecção na gestante. Por outro lado, não atravessa a placenta, e sua presença no sangue do feto ou do recém-nascido é diagnóstico de transmissão congênita da infecção. Entretanto, no sangue de pacientes com toxoplasmose congênita, o anticorpo pode ser encontrado por tempo prolongado (um ano) e durante períodos de recrudescências, após a suspensão da terapêutica com Sulfapirimetamina (Pinon et al. 1985).

2.5.3 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE NA GESTANTE E NO FETO

A primo-infecção é indicada pela soroconversão e perfil sorológico de infecção recente, presença ou não de manifestações clínicas de fase aguda da toxoplasmose. Sua detecção sorológica tem valor para o diagnóstico do paciente enfermo, mas assume grande importância na gestante, na prevenção da toxoplasmose congênita (Ferreira, 2001). É preciso insistir que, na grande maioria dos casos, somente há transmissão fetal da toxoplasmose quando a primoinfecção ocorre na vigência de gestação. Em cerca de 80% dos casos a infecção é oligo ou assintomática, o que não diminui sua gravidade para o feto. É frequente a transmissão vertical da toxoplasmose por gestante imunocomprometida apresentando perfil sorológico de toxoplasmose crônica, como vêm ocorrendo na síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) ou em outras doenças imunodepressoras como na doença de Hodgkin, no lupus eritematoso sistêmico, na pancitopenia, por vezes anos após a interrupção da medicação por corticosteróides (Desmonts et al. 1990). O relato de bons resultados terapêuticos na prevenção e na redução da gravidade da toxoplasmose congênita torna obrigatória a triagem de gestantes de risco, soronegativas, assim como o acompanhamento daquelas com perfil de toxoplasmose recente ou que se identifiquem com os perfis já citados anteriormente (Daffos et al. 1988; Hohlfeld et al. 1990; Guerina et al. 1994; McAuley et al. 1994).

Pelo grande contingente de gestantes desprovidas de anticorpos para o toxoplasma (não raro de 50 a 60% ou mais) há necessidade de repetição dos testes a cada quatro ou cinco semanas nas que permanecem soronegativas. Para essa triagem são necessários testes sensíveis, de execução simples e de baixo custo, capazes de detectar anticorpos IgG e IgM e que possam fornecer resultados em curto prazo. Anteriormente considerado inadequado para a triagem de gestantes de risco, pela baixa sensibilidade na fase aguda da toxoplasmose (Remington et al. 1994), o teste de Hemaglutinação Indireta, quando realizado com os reagentes atuais, mostra-se muito prático e adequado. De sensibilidade elevada, é capaz de detectar desde 5 UI/ml de anticorpos IgG e de assinalar a presença de anticorpos IgM (Camargo et al. 1989). A maior dificuldade no diagnóstico sorológico ocorre nos casos em que a IgM está positiva por ocasião da primeira consulta pré-natal. A sua presença nem sempre indica uma infecção aguda recente, pois com o aumento da sensibilidade dos testes sorológicos para toxoplasmose com detecção de IgM por períodos superiores a um ano após a infecção aguda, recorre-se a outros métodos sorológicos para tentar estabelecer, retrospectivamente o momento da soroconversão. O diagnóstico da infecção aguda nestes casos exige a demonstração de aumento nos títulos de anticorpos, maior ou igual a três diluições, em duas amostras colhidas com intervalo de três semanas e testadas em paralelo. Às vezes há necessidade da realização de outros testes como avidéz da IgG e dosagem de IgA e/ou IgE (Camargo et al. 1991). Idealmente, deve-se utilizar uma combinação de dois testes para confirmação diagnóstica (Remington et al. 2001).

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

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

Para o diagnóstico de certeza da infecção fetal, há necessidade de testes para a detecção do *T. gondii*. Esta detecção pode ser feita por cultura em células ou inoculação em camundongos, por determinação dos antígenos parasitários através de técnica Imuno-histoquímica ou, principalmente, por identificação de seqüências de ácidos nucléicos através da PCR em qualquer tipo de tecido ou fluido corporal (Grover et al. 1990; Hohlfeld et al. 1994).

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

A pesquisa de anticorpos IgG no sangue de cordocentese não tem valor diagnóstico pela presença de anticorpos maternos de transferência passiva, enquanto a pesquisa de anticorpos IgM reveladores de infecção fetal, embora de alta especificidade, é de sensibilidade reduzida, pois se positiva em apenas 20% a 30% de casos, após a 20^a ou a 22^a semanas de gestação. Essa porcentagem tende a aumentar com o amadurecimento imunológico do feto, podendo chegar ao recém-nascido a 50% ou mais (Remington et al. 1994; Daffos et al. 1988). A pesquisa de anticorpos IgA no sangue de cordocentese tem sido sugerida como mais sensível, de 70% a 90% (Decoster et al. 1992; Foudrinier et al. 1995; Stepick-Biek et al. 1990; Gandilhon et al. 1994). No sangue fetal podem-se encontrar indícios indiretos da infecção, como eosinofilia, plaquetopenia e níveis elevados de IgM total e de enzimas, como a gama-glutamil transferase e a desidrogenase láctica (Daffos et al. 1988).

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

2.5.4 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE NO RECÉM-NASCIDO

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

No recém-nascido, a resposta humoral pode auxiliar o diagnóstico, sendo muito importante, para este fim o exame tanto do soro da criança como da mãe. Na presença de sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose, altos títulos de anticorpos IgG no recém-nascido, aliados a um perfil materno de infecção recente tem alto valor preditivo positivo de toxoplasmose congênita, mas que deverá ser comprovado pela positividade, na criança, de teste para anticorpos IgM ou pela evidenciação do *T. gondii*. Outra comprovação, de alta sensibilidade, são perfis diferentes de anticorpos IgG maternos e da criança, no teste de Immunoblot com antígenos do *T. gondii* (Chumpitazi et al. 1995; Gross et al. 1992). Esses, distribuídos em bandas de pesos moleculares crescentes, são incubados com os soros e, após revelação, identificam-se as bandas com que os anticorpos reagiram. O soro do recém-nascido não infectado irá originar perfil semelhante ao materno, enquanto diverso se infectado, produzindo seus próprios anticorpos, cuja reatividade característica soma-se à da mãe (Chumpitazi et al. 1995). Anticorpos IgM no soro da criança fazem diagnóstico de infecção congênita, exceto nos primeiros cinco dias de vida quando, se presentes no soro materno, podem ter contaminado o sangue do recém-nascido durante o nascimento. Neste caso sua duração é curta, pois a meia-vida da IgM é de cinco dias. A pesquisa de anticorpo IgM é de baixa sensibilidade no teste clássico de imunofluorescência, de apenas 20% a 30%, e ainda com alto risco de resultados falso-positivos. Estes são removidos pela precipitação prévia de IgG da amostra, o que também eleva a sensibilidade do teste para cerca de 50%. Mais sensíveis e específicos são os testes de captura de IgM, especialmente os ensaios fluorométricos, como o teste VIDAS-IgM que atingem sensibilidade de 80% a 90%, e maior ainda no teste de immunoblot (Chumpitazi et al. 1995). Como nem todo recém-nascido infectado tem capacidade de produzir anticorpos, nos casos suspeitos recomenda-se que a pesquisa de anticorpos IgM seja repetida um e dois meses após o nascimento (Camargo, 2001)

Os títulos de anticorpos IgG caem progressivamente, nos recém-nascidos não infectados, até negativação em prazos de poucos meses a um ano (Thulliez et al. 1992). Porém, nos infectados estes títulos são permanentes ou ascendentes, com exceção dos casos de imaturidade imunológica, quando a criança com toxoplasmose não produz anticorpos,

havendo queda dos títulos, podendo chegar a negatificação por esgotamento dos anticorpos de transferência passiva, para se elevarem em seguida à medida do despertar da resposta humoral (Remington et al. 1994).

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

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

2.6 TRATAMENTO

Os medicamentos recomendáveis atualmente pertencem a três grupos:

■ **Sulfamídicos:** De ação rápida: têm maior suporte experimental e clínico, em especial a sulfadiazina (100-200mg/kg/dia, até 6g/dia); de ação intermediária, como o sulfametoxazol (40 mg/kg/dia, até 2g/dia) e de ação lenta ou ultralenta como a sulfadoxina (20-30mg/kg/dose semanal, até 1-1,5g/semanal).

■ **Diaminopiridinas:** Expoente experimental e clínico é a pirimetamina (0,5-1 mg/kg/dia, até 25-50 mg/dia); o trimetoprim tem suporte experimental menos sólido. A utilização diária da pirimetamina implica em risco de distúrbios hematológicos, podendo o ácido folínico (1-10mg/dia) ser prescrito, concomitantemente, como medida preventiva dos mesmos.

■ **Antibióticos:** Representados basicamente pela espiramicina (40-50mg/kg/dia, até 2-3g/dia), de ampla utilização em países europeus.

Embora existam dificuldades na obtenção de deduções seguras acerca da efetividade clínica do tratamento da toxoplasmose humana, por outro lado há respaldo em pelo menos quatro níveis apontando para a utilidade de tais tratamentos:

1. Os resultados favoráveis das investigações experimentais, principalmente na toxoplasmose em camundongo, observados com os medicamentos mencionados;

2. O benefício impressionante, com redução da mortalidade, quando do tratamento da toxoplasmose ativa em pacientes com imunodepressão, pelo emprego da sulfadiazina e pirimetamina;

3. Evidências favoráveis sugeridas pelo tratamento de pacientes com coriorretinite toxoplásmica ativa;

4. O possível valor em neonatos com toxoplasmose congênita subclínica, quando o tratamento parece reduzir o advento ou a expressividade de eventuais seqüelas.

O tratamento mais eficiente é representado pela utilização de sulfadiazina e pirimetamina, administradas de maneira concomitante diária. Sobretudo observações de caráter experimental e resultados obtidos em pacientes imunodeprimidos, intensamente acometidos pela toxoplasmose, apoiam essa escolha. Como decorrência desse ponto de vista, toda vez que a toxoplasmose assumir forma clínica interpretada como grave (risco de vida ou de seqüelas expressivas) é formal a recomendação desses dois compostos (Neto et al. 1982).

2.6.1 GESTANTE COM TOXOPLASMOSE AGUDA

O tratamento precoce da grávida com primoinfecção toxoplásmica é bastante útil no sentido de reduzir o risco de transmissão para o feto ou diminuir a gravidade do acometimento deste. Antes, a única droga preconizada era a espiramicina, pela sua virtual ausência de riscos para o feto. Atualmente associa-se a pirimetamina-sulfadiazina durante a gestação, pondo-se de lado os seus efeitos teratogênicos e/ou tóxicos (na realidade menos comuns do que se supunha), diante da superioridade dos benefícios observados (Neto et al. 1982).

O tratamento materno pode prevenir ou atenuar a doença congênita. A espiramicina é indicada para o tratamento de gestantes com infecção aguda cujo feto não está infectado ou não foi avaliado para o diagnóstico de infecção. Apesar de os estudos que avaliam os resultados em longo prazo ainda não estarem concluídos, o tratamento materno com a espiramicina parece controlar a infecção placentária e reduzir as taxas de transmissão em até 60% (Desmonts & Couvreur, 1974). A combinação de sulfadiazina e pirimetamina é indicada para gestantes de idade gestacional superior a 16-21 semanas cujo feto tem infecção confirmada ou muito provável. Segundo estudo realizado em Paris, essa associação mostrou-

se mais efetiva na redução da gravidade da doença e na melhora no prognóstico fetal e neonatal (Hohlfeld et al. 1990).

2.6.2. CRIANÇA COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A toxoplasmose congênita deve ser tratada com terapêutica específica em todos os recém-nascidos (RN) quer na forma sintomática ou subclínica, sendo neste último caso com a finalidade de prevenir as seqüelas tardias que possam ocorrer (Couvreux et al. 1980). Os agentes que são recomendados para terapêutica específica são benéficos contra a forma de taquizoíta e nenhum medicamento tem se mostrado efetivo para erradicar a forma encistada do parasito, principalmente os cistos presentes no sistema nervoso central e olho. A prevenção da toxoplasmose congênita é de fundamental importância para um melhor controle da infecção evitando as graves seqüelas que podem ocorrer no feto e no RN (Remington, 2001).

As drogas utilizadas para o tratamento da toxoplasmose congênita no RN são: pirimetamina (Daraprim), sulfadiazina e ácido fólico. A pirimetamina é um substituto da fenilpirimidina, droga antimalárica, cuja vida média plasmática no RN e crianças menores de 18 meses de idade é de aproximadamente 60 horas. No líquido cefalorraquiano atinge 10% a 20% dos níveis séricos. O fenobarbital pode induzir a produção de enzimas hepáticas capazes de degradarem a pirimetamina, resultando em níveis séricos mais baixas com diminuição da sua vida média. A pirimetamina e sulfadiazina atuam sinergicamente contra o *T. gondii* com uma atividade combinada oito vezes maior do que se fossem utilizadas isoladamente. Outras sulfas podem também ser usadas, sendo tão efetivas quanto à sulfadiazina, como: a sulfapirazina, a sulfametazona e a sulfamerazina (Diniz et al. 2003). A pirimetamina inibe a dihidrofolato redutase, a qual é importante na síntese do ácido fólico, levando à depressão reversível e geralmente gradual da medula óssea. A neutropenia (reversível) constitui a ação tóxica mais importante. A superdosagem acidental da pirimetamina em crianças pode resultar em vômitos, tremores, convulsões e depressão da medula óssea (Diniz et al. 2003). A espiramicina, que anteriormente fazia parte do esquema terapêutico da toxoplasmose congênita no RN, não tem sido mais recomendada e tem falhado para prevenir a neurotoxoplasmose em pacientes imunodeprimidos e há ainda pouca informação em relação a sua eficácia no RN com toxoplasmose congênita, bem como a melhor dose e via de administração a serem utilizadas. Embora não apresente toxicidade

hematológica, tem sido observado alterações do ECG, comprometimento hepático e/ou renal particularmente com o uso da droga injetável. Mais recentemente, a espiramicina é indicada apenas quando a gestante apresenta toxoplasmose como infecção ativa durante a gravidez, com a finalidade de reduzir a transmissão materno-fetal (Diniz et al. 2003).

O tratamento da criança infectada sintomática ou assintomática deve ser iniciado precocemente e prolongar-se até no mínimo um ano de idade. Ininterrupto até os dois anos de vida nas crianças que tiverem nascido com seqüelas oculares, auditivas e cerebrais, pois pode minimizá-las e melhorar o prognóstico. Vários esquemas terapêuticos têm sido utilizados no tratamento da toxoplasmose congênita. O esquema de Couvreur (1984) é o mais difundido e consiste no emprego alternado de espiramicina com sulfadiazina e pirimetamina durante um ano, de acordo com o estado clínico, como descrito abaixo. Comparando com crianças não tratadas, este autor observou menor incidência de recorrência de lesões oculares (18% vs 2,4%) e estabilização da infecção em 40% dos casos graves (Couvreur et al. 1980). Atualmente, tem-se dado maior importância ao tratamento prolongado com sulfadiazina associada à pirimetamina e ao ácido fólico, para diminuir a intensidade das seqüelas (Diniz et al. 2003).

Os seguintes esquemas terapêuticos podem ser usados (Couvreur, 1984):

- 1. Toxoplasmose congênita sintomática:** pirimetamina (1mg/kg/dia) e sulfadiazina (85 mg/kg/dia) nos primeiros seis meses, associados ao ácido fólico injetável na dose de 5 mg a cada três dias e, após, ciclos de 30 dias alternados de pirimetamina + sulfadiazina e espiramicina (100mg/kg/dia) até 1 ano.
- 2. Toxoplasmose congênita sintomática com evidência de processo inflamatório** (coriorretinite e/ou proteinorraquia elevada – maior que 1g/dl em crianças com menos de um mês): esquema 1 associado à prednisona 1,5 mg/kg/dia, até estabilização do processo inflamatório.
- 3. Toxoplasmose congênita assintomática:** pirimetamina + sulfadiazina durante seis semanas e, após, espiramicina por seis semanas intercaladas com quatro semanas de pirimetamina + sulfadiazina até completar um ano.
- 4. Recém-nascido assintomático** com resultado sorológico inconclusivo, cuja mãe teve infecção comprovada durante a gestação: sulfadiazina + pirimetamina durante um mês e reavaliação clínica e sorológica para definir a continuidade ou suspensão do tratamento.

5. Recém-nascido assintomático de mãe com sorologia sugestiva de infecção recente, mas sem dados para definir se a infecção ocorreu durante a gestação: espiramicina durante um mês e reavaliação posterior como no item 4.

Estudo multicêntrico realizado em Chicago (McAuley et al. 1994), estabeleceu outro protocolo de tratamento para crianças com infecção congênita sintomática. A proposição desse esquema foi motivada por relatos de casos de adultos com imunodeficiência que desenvolveram encefalite pelo *T.gondii* na vigência de profilaxia com espiramicina e somente apresentaram resolução das lesões neurológicas após o uso de múltiplas doses de pirimetamina e sulfadiazina (Leport et al. 1986). Os autores desse novo esquema terapêutico para toxoplasmose congênita partiram da hipótese de que, em crianças em fase de maturação imunológica, o uso combinado e prolongado de sulfadiazina e pirimetamina permitiria um melhor controle das lesões teciduais causadas pelo parasito. Após quatro anos de acompanhamento das crianças tratadas com o esquema proposto por McAuley, comparativamente às crianças não tratadas e descritas por Eichenwald et al. (1959) observou-se redução significativa da ocorrência de deficiência motora nas crianças tratadas (69% vs 22%); convulsões (81% vs 11%); retardo mental (86% vs 32%); hidro e microcefalia (32% vs 26%), sem ter havido, no entanto, diferenças na incidência de deficiência auditiva grave (59% vs 58%). Ainda, outros estudos utilizando sulfadiazina e pirimetamina durante um ano, mostraram resolução ou diminuição das calcificações intracranianas em 75% das crianças tratadas e prevenção da recorrência das lesões oculares.

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

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

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

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

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

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

2.7 MEDIDAS PROFILÁTICAS

A prevenção da toxoplasmose congênita pode ser dividida em três categorias: primária, secundária e terciária. A prevenção primária caracteriza-se basicamente por programas de educação e saúde pública, recomendando às gestantes que evitem contato com materiais potencialmente contaminados como fezes de gatos e ingestão de carne crua ou mal cozidos. Além disso, enfatiza-se o uso de luvas ao manusear a terra. Estas orientações, quando aplicadas no pré-natal, contribuem com a redução de 63% da primoinfecção na gravidez (Foulon, 1992). A prevenção secundária consiste em tentar evitar a transmissão transplacentária do parasito, através da adoção do diagnóstico precoce da infecção na gestante e de seu tratamento antiparasitário. Um diagnóstico sorológico realizado na mulher em idade procriativa, identificando as soronegativas como de risco para adquirirem a infecção na gestação, seleciona aquelas que necessitam de vigilância pré-natal quanto à possibilidade de infecção aguda pelo *T. gondii*. O diagnóstico de doença aguda na gestante permite a introdução precoce de uma terapêutica adequada, podendo impedir o aparecimento da infecção congênita (mais raramente) ou diminuir a incidência de formas graves na criança congênitamente afetada (Foullon et al. 1994). E a prevenção terciária finalmente concentra seus esforços em realizar um diagnóstico precoce através da dosagem de anticorpos específicos IgA e IgM em sangue coletado de recém-nascido que permita a introdução de esquema terapêutico para prevenir ou minimizar seqüelas (Hall, 1992).

Há instituição de programas educacionais para gestantes e imunossuprimidos associada aos programas de triagem sorológica pré-natal que pode reduzir de maneira significativa a transmissão e a ocorrência de formas graves da infecção pelo *T. gondii*. O rastreamento sorológico da toxoplasmose no pré-natal é obrigatório em poucos países, como na França e Áustria e mais recentemente em alguns estados brasileiros. Em Goiânia, a partir de setembro de 2002 teve início uma ação conjunta entre a UFG e as Secretarias Estadual e Municipal de Saúde num programa intitulado “Controle da Transmissão Vertical da

Toxoplasmose”. Passou a se incluir a sorologia para toxoplasmose no pré-natal, o que possibilitou o encontro de pacientes agudamente infectadas, ou reinfectadas, incluídas nesse estudo.

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

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

3- OBJETIVOS

3.1 GERAL

Otimização e avaliação do diagnóstico sorológico e parasitológico da toxoplasmose em gestantes de risco e recém-nascidos após terapêutica específica, utilizando as reações de imunofluorescência indireta, histopatologia e imunohistoquímica experimental, inoculação em camundongos e PCR.

3.2 ESPECÍFICOS

- 1- Estudar a virulência de três estoques de *T. gondii* isolados de grávidas de risco e recém-nascidos com toxoplasmose congênita;
- 2- Comparar a susceptibilidade das linhagens de camundongos BALB/c, BALB/xid e Swiss à infecção pelo *T. gondii*;
- 3- Padronizar a PCR e comparar a sensibilidade entre dois diferentes pares de primers;
- 4- Avaliar o diagnóstico parasitológico (inoculação experimental, histopatologia, imunohistoquímica e PCR) da toxoplasmose congênita em pacientes de risco após terapêutica específica;
- 5- Avaliar experimentalmente a transmissão do *T. gondii* pelo aleitamento materno;

4 – RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em forma de artigos, as figuras e tabelas estão inseridas no texto para facilitar a leitura pela banca examinadora.

1º ARTIGO:

BIOENSAIOS DE TRÊS ESTOQUES DE *T. gondii* ISOLADOS DE GRÁVIDAS DE RISCO E RECÉM-NASCIDO COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A ser submetido à **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**

2º ARTIGO:

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA TOXOPLASMOSE EM PACIENTES DE RISCO APÓS TERAPÊUTICA ESPECÍFICA ATRAVÉS DA INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL, HISTOPATOLOGIA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E PCR

A ser submetido à **Revista Memória Instituto Oswaldo Cruz**

3º SHORT COMMUNICATION:

TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DO *T. gondii* PELO ALEITAMENTO MATERNO

A ser submetido à **Revista Memória Instituto Oswaldo Cruz**

OBS: Normas para publicação das respectivas revistas anexo II.

4.1 – 1º Artigo

BIOENSAIOS DE TRÊS ESTOQUES DE *T. gondii* ISOLADOS DE GRÁVIDAS DE RISCO E RECÉM-NASCIDO COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

**Tatiane Luiza da Costa¹, Mariza Martins Avelino², Waldemar Amaral³,
Ana Maria de Castro⁴**

(1) Mestranda em Medicina Tropical na área de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública IPTSP-UFG. (2) Prof^a. Adjunto do Departamento de Pediatria e Puericultura da Faculdade de Medicina da UFG (3) Prof. Adjunto do Departamento de Ginecologia da Faculdade de Medicina da UFG. (4) Prof^a. Adjunto da disciplina de Parasitologia e, orientadora desse estudo dentro do PPGMT no IPTSP-UFG.

Autor de correspondência:

Profa. Dra. Ana Maria de Castro

amaria@iptsp.ufg.br

Laboratório de Biologia, Fisiologia e Imunologia de Protozoários de Interesse Humano DMIPP/IPTSP-UFG.

Rua 235 esq/ 1^a. Av. s/n Setor Leste Universitário, Goiânia Goiás –74605-050.

Fone: (62).3521-1840 Fax: (62) 3521-1837

RESUMO

O objetivo deste trabalho é estudar a virulência de três estoques de *T. gondii* isolados de grávidas de risco e recém-nascidos com toxoplasmose congênita, comparar a susceptibilidade das linhagens de camundongos BALB/c, BALB/xid e Swiss à infecção pelo *T. gondii*, padronizar a PCR e comparar a sensibilidade entre dois diferentes pares de primers. Foram realizadas curvas de sobrevivência de camundongos infectados com três estoques de *T. gondii*, isolados sangue periférico de recém-nascido com toxoplasmose congênita (I-3), líquido amniótico (I-15) e sangue fetal (I-20). Também foi avaliada a susceptibilidade de camundongos das linhagens BALB/c, BALB/xid e Swiss à infecção pelo *T. gondii*. Os estoques isolados mostraram-se virulentos, com comportamento semelhante ao da cepa controle RH. A linhagem BALB/c é mais susceptível à toxoplasmose, enquanto as linhagens BALB/xid e Swiss demonstraram maior resistência. Os primers T1-T2 são mais sensíveis que B5-B6, apresentando alta sensibilidade (83 a 100%) com as amostras testadas, incluindo sangue. Assim estes métodos podem ser utilizados nos estudos de bioensaios, como a técnica de PCR para confirmação de infecção ativa devida a sua elevada sensibilidade e especificidade.

Palavras Chaves: Toxoplasmose experimental, *T. gondii*, PCR, BALB/c.

ABSTRACT:

Survival curves of infected mice were performed aiming the study of the virulence from three stock strains of *T. gondii*, isolated from peripheral blood from newly-born with congenital toxoplasmosis (I-3), amniotic fluid (I-15) and fetal blood (I-20), and evaluated the susceptibility of three mice lineage such as BALB/c, BALB/xid and Swiss to *T. gondii* infection. The PCR technique standardization and comparison of the sensibility of two different pairs of primers were also performed. The isolated stock strains showed to be virulent with similar behavior to the RH control strain. BALB/c mice lineage is the most susceptible to toxoplasmosis, while BALB/xid and Swiss presented greater resistance. The T1-T2 primers are more sensible than B5-B6 ones, showing high sensibility (83 to 100%) with the tested samples, including blood. Therefore these methods can be used in bioassays studies, as the PCR technique to confirm the active infection due to high sensitivity and specificity.

Key words: Experimental toxoplasmosis, *T. gondii*, PCR, BALB/c.

INTRODUÇÃO: Diferentes linhagens de animais são usadas como modelo experimental para a infecção pelo *T. gondii*, incluindo primatas, coelhos, suínos, hamsters, camundongos e ratos. Os camundongos mostraram-se bastante susceptíveis ao *T. gondii* e são importantes modelos de estudo da infecção congênita, na patologia da infecção, eficácia de vacinas, novas drogas no tratamento e no estudo comportamental de novas cepas isoladas. A patologia da infecção depende da interação parasito-hospedeiro. Existem dificuldades ao comparar resultados, pois os modelos experimentais variam de acordo com a linhagem, cepa do parasito, rota de infecção, condições de manutenção e número de passagens do parasito³⁹. Existem três grupos de roedores relatados com sensibilidade variável a infecção pelo *T. gondii*: os mais sensíveis são os hamsters Chineses, hamsters da Síria e camundongos; os moderadamente sensíveis são os gerbils e *Mastomys*; os ratos são muito resistentes¹².

As manifestações clínicas da toxoplasmose em camundongos são afetadas pelo tamanho do inóculo, via de administração, estágio do parasito e linhagem dos camundongos. A linhagem isogênica BALB/c é muito utilizada na produção de anticorpos monoclonais, e mostrou-se susceptível à infecção por vários protozoários como o *Trypanosoma cruzi*²⁹, *Leishmania major*, ao contrário da linhagem C57BL/6 que apresentou maior resistência^{23, 33}. Estudos com o *Plasmodium berghei* mostraram que a linhagem BALB/c é menos sensível que C57BL/6³². Por outro lado, os camundongos BALB/xid possuem uma mutação ligada ao cromossomo X que afeta predominantemente o desenvolvimento dos linfócitos B, permitindo o desenvolvimento de células Th1 o que lhes confere uma maior resistência, são muito utilizados em pesquisas imunológicas³⁰. Já os camundongos Swiss possuem uma grande produção de anticorpos, mas estes são de avidéz intermediária¹, podendo ser usados em pesquisas sobre o câncer, defeitos neurológicos e sensoneural. Sua resposta imune efetiva depende da via de inoculação do parasito, em contraste com o BALB/c onde a rota de infecção não é tão crítica²⁶.

Dependendo de fatores intrínsecos e extrínsecos ao parasito, nem sempre ocorre sintomatologia, sendo essencial a confirmação da infecção por métodos parasitológicos e imunológicos. A presença do *T. gondii* pode ser investigada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), onde as técnicas utilizadas na maioria dos casos detectam seqüências do gene SAG1 que codifica a glicoproteína P30, a principal proteína de membrana do taquizoíta *T. gondii*, seqüências do gene B1 com funções ainda desconhecidas e partes do DNA que codifica RNA ribossomal (rDNA). No genoma do *T. gondii* o gene SAG1 está

presente em uma única cópia, o gene B1 em 35 cópias e o gene rDNA em 110 cópias, o que explica diferentes sensibilidades encontradas em muitos protocolos não padronizados na detecção do *T. gondii*⁹. A infecção congênita aguda pode ser detectada por testes sorológicos como a Imunofluorescência indireta (IFI), mas a sensibilidade e especificidade são variáveis já que o tempo de infecção e a idade do hospedeiro podem limitar o diagnóstico da infecção³⁷, além da determinação do *cut off* da reação para cada laboratório.

A maior importância clínica do diagnóstico são os indivíduos infectados por transmissão placentária e conseqüente infecção fetal, que podem ter repercussões que variam em gravidade, dependendo do período de gestação e da virulência da cepa do *T. gondii*². A genotipagem molecular tem mostrado que aproximadamente 90% dos isolados de *T. gondii* analisados são classificados em três diferentes linhagens clonais: tipo I, tipo II e tipo III^{19, 34, 35} e que podem ter diferentes patogenicidades^{14, 36}. Os isolados do tipo I são uniformemente letais para camundongos (independente da dose), a virulência é geneticamente controlada, e mostram uma grande prevalência em toxoplasmose congênita humana^{20, 36}. Em infecções experimentais as linhagens do tipo I não desenvolvem infecções crônicas em camundongos. Os isolados tipo II são altamente propensos a produção de um grande número de cistos e patologias crônicas em camundongos. O isolado tipo III é abundante em animais e raramente visto em toxoplasmose humana. A inoculação em camundongos para a detecção da infecção é um método padrão, sensível, laborioso e caro, requer longo período de observação e manutenção de animais em biotérios, porém nos permite o isolamento do parasito^{10, 15, 16, 21}. Segundo Bastien³, o diagnóstico por PCR para a toxoplasmose está longe de ser padronizado e ainda não se tem um consenso que defina as condições do método. Além de outros fatores, a sensibilidade e a especificidade da PCR dependem não só da seqüência-alvo no DNA do parasito, mas também dos pares de iniciadores de amplificação desenhados. Apesar das raras propostas de PCR para o diagnóstico de toxoplasmose, elas não são consensuais, e mais comparações são necessárias para se conseguir uma melhor padronização, especialmente no sangue (por conter vários inibidores inespecíficos da reação).

Objetivou-se o estudo da virulência de três estoques de *T. gondii* isolados de grávidas de risco e recém-nascidos com toxoplasmose congênita, comparar a susceptibilidade das linhagens de camundongos BALB/c, BALB/xid e Swiss à infecção pelo *T. gondii*, padronizar a PCR e comparar a sensibilidade entre dois diferentes pares de primers.

MATERIAL E MÉTODOS: Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal.

Pacientes: Durante o período compreendido entre setembro de 2002 a janeiro de 2005, gestantes foram encaminhadas ao Hospital das Clínicas (HC-UFG) por apresentarem no pré-natal exames sorológicos para toxoplasmose compatíveis com infecção aguda.

Origem dos Estoques: Três estoques de *T. gondii* foram isolados através da inoculação em camundongos BALB/c. Foram obtidos de sangue periférico de recém-nascido com toxoplasmose congênita (Isolado-3; I-3), líquido amniótico (Isolado-15; I-15) e sangue fetal (Isolado-20; I-20), em gestantes com infecção ativa.

Curvas de sobrevivência: Foram realizadas com os três isolados reativados em camundongos BALB/c onde se obteve o lavado peritoneal (LP). Este, foi diluído em PBS estéril, em concentrações de 10^6 a 10^{-1} parasitos/mL e inoculados via intraperitoneal (IP) em grupos de 4 camundongos machos (n=4), com média de 30 dias de idade. Os mesmos foram observados diariamente quanto ao aspecto físico e mortalidade. Utilizou-se como controle a cepa RH.

Susceptibilidade entre diferentes linhagens: O isolado-3 (I-3) foi inoculado em três diferentes linhagens de camundongos machos (BALB/c, BALB/xid e Swiss) com média de 30 dias vida, nas concentrações de 10^3 e 10^5 parasitos/mL e inoculado via IP em grupos de três camundongos (n=3). Estes foram observados diariamente por até 60 dias e após foram sacrificados (por deslocamento cervical). Tiveram o sangue retirado (punção cardíaca) para a confirmação sorológica da infecção através da Imunofluorescência indireta (IFI). Como controle utilizamos a cepa RH.

Imunofluorescência Indireta: Utilizada para detecção dos anticorpos anti-*T. gondii*, em soro de camundongos (n=12), usando lâminas comerciais (BIOSHOP[®]), pela técnica descrita por Camargo⁵. A IFI foi realizada com os soros em diluição seriada, a partir de 1:10 para detecção de IgM e IgG. Foi usado diluição de 1:200 para o conjugado anti-IgM e 1:300 anti-IgG (anti-cadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA[®]).

Teste de Sensibilidade da PCR: O LP obtido de camundongos infectados via IP com o I-3, foi diluído em PBS estéril, em concentrações de 10^{-2} a 10^6 parasitos/mL. Foram adicionados 200µl de sangue de camundongos saudáveis às diluições do LP. Como controles positivos foram utilizadas amostras de sangue e LP dos camundongos infectados com I-3, e cepa RH

Extração do DNA: De líquidos biológicos foi realizada segundo a técnica descrita por Gomes et al.¹³; em tecido sanguíneo com Cloreto de Amônia 170mM.

Reação de Amplificação – PCR: Foram realizadas em um volume final de 25µL contendo 10mM TRIS HCl (pH 9,0), 3,5mM MgCl₂, 0,2U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 0,5mM de cada desoxinucleotídeos(dATP/ dTTP/ dGTP/ dCTP, Sigma Chemical Co., USA), 50 pmoles de cada iniciador da reação (Invitrogen) e 2µL de DNA molde, à mistura da reação foram acrescentados 40µL de óleo mineral (Sigma Chemical Co. USA). As reações foram realizadas no termociclador MasterCycler Personal. O programa de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial a 94°C (5 min), 35 ciclos de desnaturação a 94°C (1 min), anelamento a 62°C (1 min) e extensão a 72°C (1 min) seguida de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os pares de primers utilizados foram: Toxo-T1 (5'-ATG GTC CGC CCG GTG TAT GAT ATG CGA T -3'), Toxo-T2 (5'-TCC CTA CGT GGT GCC GCA GTT CCT -3') e Toxo-B5 (5'-TGA AGA GAG GAA ACA GGT GGT CG-3'), Toxo-B6 (5'-CCG CCT CCT TCG TCC GTC GTA-3'). Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% revelados pela prata segundo Santos et al.³¹. O LP, sangue e tecidos de camundongos infectados com a cepa RH foram utilizados como controle positivo.

RESULTADOS

Curvas de sobrevida: Nos grupos inoculados com I-3, I-15 e I-20 os camundongos BALB/c morreram entre o 5º e 8º dias PI nas variadas concentrações, apresentando um comportamento semelhante à cepa controle RH (Figura 1).

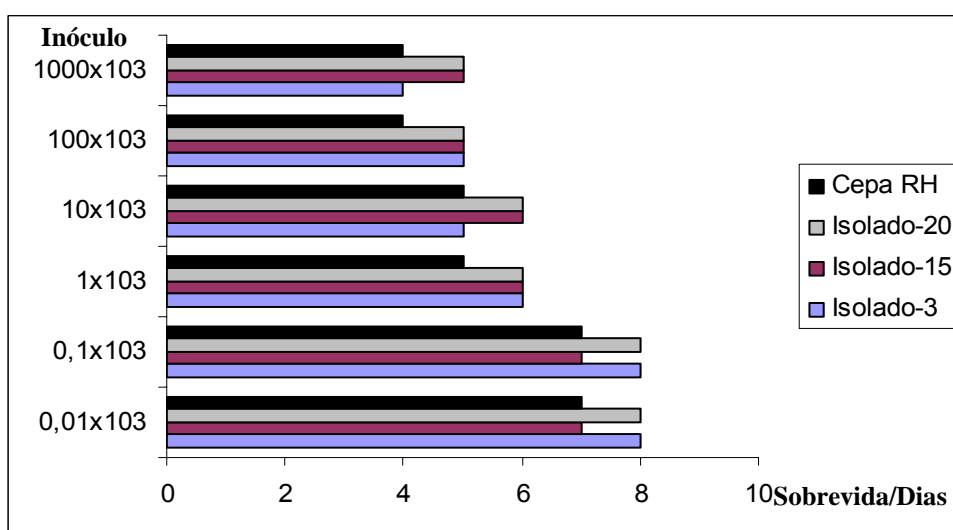


Figura 1. Curvas de sobrevida em camundongos BALB/c de três estoques isolados de grávidas com gravidez de risco e recém nascidos com toxoplasmose congênita

Susceptibilidade entre diferentes linhagens: Nos camundongos BALB/c inoculados com 10^5 parasitos todos morreram entre o 4º e 5º dia pós-inóculo. Com 10^3 parasitos morreram entre 6º e 8º dia pós-inóculo, todos com sintomatologia característica (pêlos arrepiados, letargia e diminuição do peso). Na linhagem BALB/xid inoculados com 10^5 parasitos os camundongos apresentaram sintomatologia característica no 4º dia pós inoculo, e 10^3 parasitos apresentaram a mesma sintomatologia no 6º dia pós-inóculo. Porém, não houve mortalidade e a IFI mostrou títulos negativos de IgM e 1:640 para IgG. Na linhagem Swiss, em ambos os inóculos, os camundongos não apresentaram nenhuma sintomatologia, não houve mortalidade e a sorologia apresentou títulos negativos para IgM e 1:320 para IgG (Tabela 1).

Tabela 1. Susceptibilidade entre diferentes linhagens de camundongos

Inóculo	BALB/c	BALB/xid	Swiss
10^5	Sintomas no 4 e 5º dia PI	Sintomas no 4º dia PI	Sem Sintomas
	TM	NHM	NHM
		IFI IgG (T=1:640)	IFI IgG (T=1:320)
10^3	Sintomas no 6 e 8º dia PI	Sintomas 6º dia PI	Sem Sintomas
	TM	NHM	NHM
		IFI IgG (T=1:640)	IFI IgG (T=1:320)

PI- Pós-Inóculo; TM- Todos morreram; NHM- Não Houve Mortalidade;

Teste de Sensibilidade da PCR: Analisando o LP foi possível detectar até 10^{-2} parasitos/mL, 100% de sensibilidade) com os primers T1-T2, nas diluições propostas. Utilizando B5-B6 foi possível detectar até $0,05 \times 10^3$ parasitos/mL (83% de sensibilidade). Utilizando sangue, a detecção do *T. gondii* apresentou 100% de sensibilidade com os dois pares de primers T1-T2 e B5-B6. Figura 2-5 Gráficos de sensibilidade em sangue e lavado peritoneal utilizando os primers T1-T2 e B5-B6.

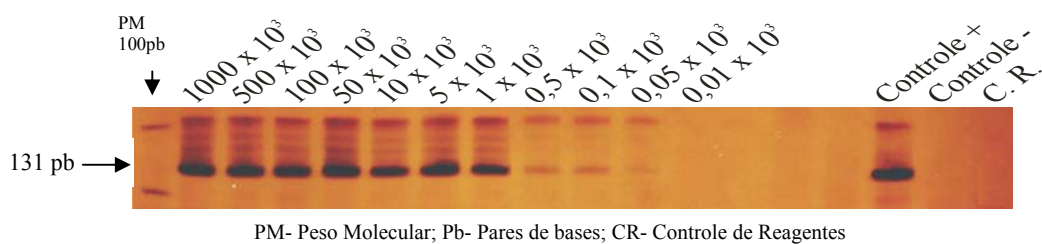


Figura 2. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando a sensibilidade dos primers B5-B6 em lavado peritoneal de camundongos.

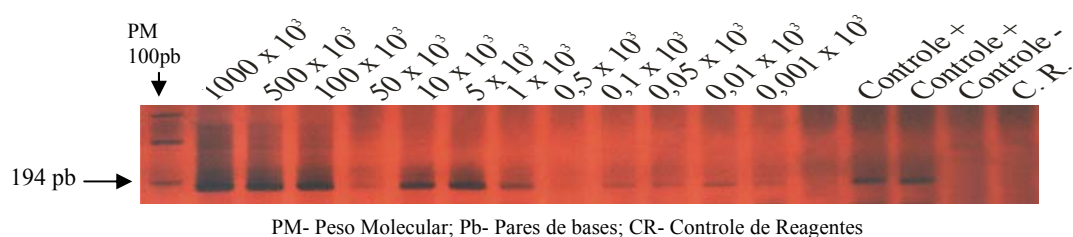


Figura 3. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando a sensibilidade dos primers T1-T2 em lavado peritoneal de camundongos.

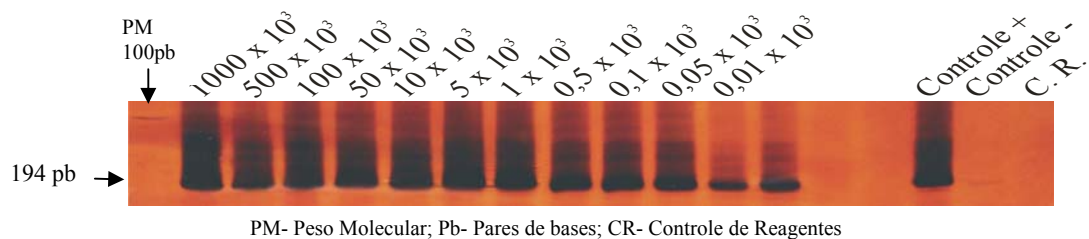


Figura 4. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando a sensibilidade dos primers T1-T2 em sangue de camundongos.

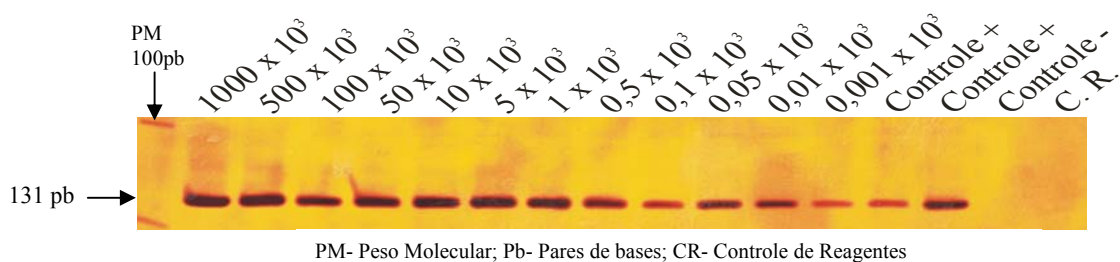


Figura 5. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando a sensibilidade dos primers B5-B6 em sangue de camundongos.

DISCUSSÃO: As curvas de sobrevivência dos três isolados apresentaram comportamento semelhante ao da cepa controle RH. São altamente virulentos, ou seja, apresentam alta mortalidade mesmo com baixas concentrações de parasitos. Esses resultados mostram-se de acordo com a literatura, onde no Brasil 70% das cepas humanas isoladas são do tipo I, e 30% são do tipo III. No surto de toxoplasmose que houve no Canadá em 1995, 20,6% das pessoas desenvolveram doença ocular, e embora tenham sido recuperados parasitos, e genotipado apenas em um dos casos, proveniente de um dos pacientes, este parasito foi identificado como da linhagem do tipo I²⁴. Relatos anteriores de isolado de *T. gondii* obtidos de animais e humanos mostram que a maioria dos isolados pertenciam à linhagem II e III, respectivamente^{19,11}. De 136 isolados de humanos que foram caracterizados molecularmente, 17% foram tipo I, 71% foram tipo II e 12% foram tipo III e apenas 3 isolados obtidos de animais foram do tipo I¹⁹. A genotipagem de nossos isolados torna-se necessária, no entanto será realizada posteriormente.

Várias linhagens de camundongos mostraram-se susceptíveis à infecção por protozoários, mas especificamente ao *T. gondii* existem poucos relatos. Neste estudo, os camundongos BALB/c mostraram-se bastante susceptível à infecção pelo *T. gondii*. Howard et al.¹⁸ demonstraram que esta linhagem é altamente susceptível à *Leishmania tropica*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania major* ao contrário da linhagem C57BL/6 que é bastante resistente. Scheller et al.³² mostrou a susceptibilidade da linhagem BALB/c em estudos com o *Plasmodium berghei*. Rowland et al.²⁹ mostraram que a linhagem BALB/c também é susceptível à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Langoni et al.²² inocularam parasitos da cepa RH de *T. gondii* em camundongos Swiss via IP e obteve 60% de sensibilidade da PCR 18h PI e com uma cepa cistogênica 100% sensibilidade 21h PI. Esta diferença foi explicada pela via de inoculação, forma de infecção, virulência da cepa e a linhagem de camundongos utilizados, pois esta não é considerada isogênica e pode não responder similarmente sob mesmas condições como em outras linhagens. Hoerauf et al.¹⁷ mostraram que camundongos BALB/xid infectados com *Leishmania major* desenvolvem lesões vagarosamente, devido a maior produção de interferon (IFN) gama que lhes conferem uma maior resistência, ao contrário dos camundongos BALB/c. Este trabalho comprovou a alta sensibilidade do teste de PCR (83 a 100%) na detecção de parasitos em lavado peritoneal e principalmente em apresentar 100% de sensibilidade em amostras com sangue, confirmando que em nossas condições de trabalho esta técnica foi bem padronizada. No geral, a sensibilidade do teste da PCR é extremamente variável de 11,5 a

100% e a especificidade é alta de 96 a 100%, esta variabilidade depende dos primers utilizado, e do material biológico utilizado^{4,6,7,8,25,27,28,38}.

O presente estudo demonstrou que os estoques isolados de sangue periférico de recém-nascido (I-3), líquido amniótico (I-15) e sangue fetal (I-20), mostraram-se virulentos em diferentes inóculos, tendo todos eles comportamento semelhante ao da cepa controle RH. A linhagem BALB/c é mais susceptível à toxoplasmose, enquanto as linhagens BALB/xid e Swiss demonstraram maior resistência. Demonstrou também que os primers T1-T2 são mais sensíveis que B5-B6, para detecção de parasitos do *T. gondii*, apresentando alta sensibilidade (83 a 100%) com os pares de primers testados nas amostras analisadas, incluindo sangue. Desta forma pode-se considerar que os métodos parasitológicos utilizados, estão bem padronizados e podem ser utilizados para estudos biológicos de estoques recentemente isolados, para confirmar infecção ativa e monitorar carga parasitaria circulante, bem como validar a eficácia do tratamento específico para toxoplasmose.

BIBLIOGRAFIA:

- 1- Alpers JH, Steward MW, Soothill JF. Differences in immune elimination in inbred mice. The role of low affinity antibody. Clin Exp Immunol 12 (1): 121-132,1972.
- 2- Avelino MM, Campos Jr D, Parada Jr B, Castro AM. Risk factors for toxoplasma childbearing age. BJID 8 (1): 164-174, 2004.
- 3- Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 96: 205–215, 2002.
- 4- Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware P L, Boothroyd J C. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 141: 3584–3591, 1988.
- 5- Camargo ME. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev Brasileira de Patologia Clínica 10: 87-107, 1974.
- 6- Cingolani A, De Luca A, Ammassari A, Murri R, Linzalone A, Grillo R, Antinori A. PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the differential diagnosis of AIDS-related focal brain lesions. J. Med. Microbiol. 45: 472–476, 1996.
- 7- Cinque P, Vago L, Dahl H, Brytting M, Terreni M R, Fornara C, Racca S, Castagna A, Monforte A D, Wahren B, Lazzarin A, Linde A. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic diseases of the central nervous system in HIV infected patients. AIDS 10: 951–958, 1996.
- 8- Dupon M, Cazenave J, Pellegrini JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fisher I, Leng B, Locut JY. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus seropositive patients. J Clin Microbiol. 33(9): 2421-2426, 1995.

- 9- Ellis JT. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 28: 1053-1060, 1998.
- 10- Esteban-Redondo I, Maley SW, Thomson K, Nicoll S, Wright S, Buxton D, Innes EA. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Veterinary Parasitology* 86:155-171, 1999.
- 11- Fuentes IJM, Rubio C, Ramirez C, Alvar, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: Direct analysis from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1566-1570, 2001.
- 12- Fujii H, Kamiyama T, Hagiwara T. Species and strain differences in sensitivity to *Toxoplasma* infection among laboratory rodents. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 36: 343-346, 1983.
- 13- Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Galvão LMC, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 88: 28-33, 1998.
- 14- Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 294: 161-165, 2001.
- 15- Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 28(10): 2297-2301, 1990.
- 16- Hitt JA, Filice GA. Detection of *T. gondii* parasite by gene amplification, cells culture, and mouse inoculation. *J Clin Microbiol* 30(12): 3181-3194, 1992.
- 17- Hoerauf A, Solbach W, Lohoff M, Rollinghoff M. The Xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. *Int Immunol.* Aug 6(8):1117-1124, 1994.

- 18- Howard JG, Hale C, Chan-Liew. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. Parasite Immunol. 2: 303-314, 1980.
- 19- Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal diseases. J. Infect. Dis. 172:1561-1566, 1995.
- 20- Howe DK, Summers BC, Sibley LD. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. Infect Immun.64: 5193-5198, 1996.
- 21- James GS. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *T. gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. J Clin Microbiol 34(6): 1572-1575, 1996.
- 22- Langoni H, Das Dores CB, Silva RC, Pezerico SB, Castro APB, Da Silva AV. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in sera samples of mice experimentally infected. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 12 (2): 208, 2006.
- 23- Laskay T, Diefenbach A, Rollinghoff M, Solbach W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. Eur J Immunol 25 (8):2220-2227, 1995.
- 24- Lehmann T, Blackston CR, Parmeley SF, Remington JS, Dubey JP. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: Comparison of antigen-coding and house-keeping genes. Journal of Parasitology 86: 960-971, 2000.
- 25- Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. J. Infect. Dis.15(Suppl. 1): S73-S82, 2002.
- 26- Nabors GS, Farrell JP. Site-specific to *Leishmania major* in SWR mice: The site of infection influences susceptibility and expression of the antileishmanial immune response. Infect. Immun. 62: 3655-3662, 1994.

- 27- Pelloux H, Dupouy-Camet J, Derouin F, Aboulker JP, Raffi F, and the Bio-Toxo Study Group. A multicentre prospective study for the polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. *AIDS* 11: 1888–1890, 1997.
- 28- Priya J, Caldero'n MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, Chavez V, Jimenez JA, Chang MC, Lopez MJ, Evans CA. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J. Clin. Microbiol* 40: 4499-4503, 2002.
- 29- Rowland EC, Lozykowski MG, McCormick TS. Differential cardiac histopathology in inbred mouse strains chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology* 78: 1059-1066, 1992.
- 30- Santos-Lima EC, Vasconcellos R, Reina-San-Martin B, Fesel C, Cordeiro-Da-Silva A, Berneman A, Cosson A, Coutinho A, Minoprio P. Significant association between the skewed natural antibody repertoire of Xid mice and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol.* 31(2) Feb: 634-645, 2001.
- 31- Santos FR, Pena SDJ, Epplen JT. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet* 90: 655-656, 1993.
- 32- Scheller LF, Wirtz RA, Azad AF. Susceptibility of different strains of mice to hepatic infection with *Plasmodium berghei*. *Infect. Immun.* 62: 4844-4847, 1994.
- 33- Scott P, Eaton A, Gause WC, di Zhou X, Hondowicz B. Early IL-4 production does not predict susceptibility to *Leishmania major*. *Exp Parasitol* 84 (2): 178-187,1996.
- 34- Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359: 82-85, 1992.

- 35- Sibley LD. Recent origins among ancient parasites. *Vet. Parasitol.* 115:185-198, 2003.
- 36- Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley LD. Identification of quantitative traci loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proceedings. National Ac. Sc* .99: 10753-10758, 2002.
- 37- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30: 1217-1258, 2000.
- 38- Vidal JE, Colombo FA, Penalva de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J. Clin. Microbiol* 42: 4765-4768, 2004.
- 39- Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma gondii*: Kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp. Parasitol.* 90: 86-94, 1998.

4.2- 2º Artigo

Diagnóstico parasitológico da toxoplasmose em pacientes de risco após terapêutica específica utilizando inoculação experimental, histopatologia, imuno-histoquímica e PCR

Tatiane Luiza da Costa¹, Marcos Gontijo da Silva², Juliana Boaventura Avelar³, Waldemar Naves do Amaral⁴, Mariza Martins Avelino⁵, Heitor Franco de Andrade Júnior⁶, Ana Maria de Castro⁷.

(1 e-3) Mestranda em Medicina Tropical na área de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública IPTSP-UFG. (2) Mestre em Medicina Tropical na área de Parasitologia pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública IPTSP-UFG. (4) Prof. Adjunto do Departamento de Ginecologia da Faculdade de Medicina da UFG. (5) Prof^ª. Adjunto do Departamento de Pediatria e Puericultura da Faculdade de Medicina da UFG. (6) Prof. Lab. Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da USP. (7) Prof^ª. Adjunto da disciplina de Parasitologia e, orientadora desse estudo, no PPGMT do IPTSP-UFG.

Autor de correspondência:

Profa. Dra. Ana Maria de Castro

amaria@iptsp.ufg.br

Laboratório de Biologia, Fisiologia e Imunologia de Protozoários de Interesse Humano do DMIPP/IPTSP-UFG.

Rua 235 esq/ 1^a. Av. s/n Setor Leste Universitário, Goiânia Goiás –74605-050.

Fone: (62) 3521-1840 Fax: (62) 3521-1837

RESUMO:

O diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita é de fundamental importância, pois subsidia o tratamento e a redução das seqüelas que o parasito pode provocar no concepto. Este trabalho teve como objetivo o diagnóstico parasitológico da toxoplasmose congênita em gestantes de risco e seus recém-nascidos após terapêutica específica, utilizando a inoculação experimental, histopatologia, imunohistoquímica e PCR. Foram analisadas 146 amostras, sendo 54 amostras de sangue fetal, 38 de líquido amniótico, 22 de sangue materno; 32 de recém-nascidos, 9 de sangue e 23 de líquido. Essas foram inoculadas em camundongos BALB/c (observados por 30 dias). Após, tiveram o sangue coletado para a realização da imunofluorescência indireta. Do encéfalo, foram realizadas histopatologia e imunohistoquímica. A PCR foi realizada em 52 amostras humanas. A IFI experimental apresentou títulos iguais ou inferiores a 1:40, sendo considerada negativa. A histopatologia, imunohistoquímica e PCR não demonstraram a presença do parasito em tecidos e líquidos biológicos. Os métodos de diagnósticos parasitológicos apresentaram-se negativos, não sendo possível detectar parasitos nas amostras analisadas. Estes dados demonstraram que o tratamento elimina o parasito circulante na infecção ativa, melhorando consideravelmente o prognóstico da infecção fetal.

Palavras Chaves: Toxoplasmose congênita, *T. gondii*, PCR, diagnóstico parasitológico.

ABSTRACT:

The precocious diagnosis of congenital toxoplasmosis is of intrinsic importance because it fundamentals the treatment and sequelae reduction that could occur in the concept. This study aimed the parasitological diagnosis of congenital toxoplasmosis in suspected patients after specific treatment using the experimental inoculation, histopathology, immunohistochemistry and PCR techniques. 54 fetal blood samples, 38 from amniotic fluid, 22 from maternal blood, 32 from newly-born, 9 from blood and 23 from cerebrospinal fluid were analyzed. These samples were inoculated into BALB/c mice (followed up during 30 days). After this period their peripheral blood was collected and used to indirect immunofluorescence. From the encephala, histopathology and immunohistochemistry were performed. The PCR technique was performed in 52 human samples. The experimental IFI presented titer equal or inferior to 1:40, and therefore, considered negative. The histopathology, immunohistochemistry and PCR techniques did not showed the parasite's presence neither in tissues nor in biological fluids. The parasitological diagnostic methods resulted negative, making impossible to detect parasites in the analyzed samples. These data demonstrate that the treatment eliminate the circulating parasites in active infections, improving considerably the prognosis of fetal infection.

Key words: Congenital toxoplasmosis, *T. gondii*, PCR, parasitological diagnosis.

INTRODUÇÃO: As infecções congênitas se encontram entre as principais causas de morbidade e mortalidade no período neonatal (Wallon et al. 2004). Em Goiânia, a toxoplasmose é de relevante importância, pela elevada incidência em gestantes de 8,9% (Avelino et al. 2003). A toxoplasmose congênita é uma das formas mais graves da doença. A transmissão transplacentária pode ocorrer durante infecção aguda adquirida pela mãe durante a gestação ou pela reagudização da infecção materna. As consequências da toxoplasmose para o feto dependem do grau de exposição aos agentes, da virulência da cepa e do período de gestação (Kawazoe, 2002). Frequentemente há sub-diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose congênita devido ao fato de 90% dos fetos e/ou recém-nascidos infectados serem assintomáticos ou oligossintomáticos, podendo assim permanecerem por anos (Wong & Remington, 1994; Wallon et al. 2004). Nos casos subclínicos, o ideal seria a demonstração da parasitemia no neonato, o que pode ser realizado por meio de isolamento do parasito em animais, imuno-histoquímica, histopatologia e PCR de líquidos biológicos e tecidos, incluindo sangue. O diagnóstico desta protozoose pode ser realizado por métodos indiretos como a sorologia através da Imunofluorescência Indireta (IFI), ou pela pesquisa direta de cistos e taquizoítas em tecidos através de cortes histológicos, seja corados pela Hematoxilina Eosina (HE), seja pela Imuno-histoquímica (IH), ou através de bioensaios, inoculando amostras biológicas humanas em camundongos. Os métodos parasitológicos na fase crônica da toxoplasmose são de baixa sensibilidade, devido à ampla disseminação do seu agente e ao seu histotropismo (Wong & Remington, 1993; Amendoeira et al. 1999; Rey, 1991). Mas nas infecções ativas, o parasito está em fase proliferativa, tornando estes métodos de alta sensibilidade. Assim este trabalho objetivou-se avaliar o diagnóstico parasitológico (inoculação experimental, histopatologia, imunohistoquímica e PCR) da toxoplasmose congênita em pacientes de risco após terapêutica específica.

MATERIAL E MÉTODOS: Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal.

Pacientes: Durante o período compreendido entre setembro de 2002 a janeiro de 2005, gestantes foram encaminhadas ao Hospital das Clínicas (HC-UFG) por apresentarem no pré-natal exames sorológicos para toxoplasmose compatíveis com infecção aguda.

Amostras: Foram coletadas amostras para o diagnóstico de infecção congênita por profissional médico responsável. Um total de 146 amostras foram obtidas, sendo: 114 de

gestantes (54 de sangue fetal, 38 de líquido amniótico, 22 de sangue materno), 32 recém-nascidos (9 sangue e 23 líquor). Todas as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm (Fanem 204), por dez minutos, parte dela sendo inoculada em camundongos e outra parte congelada para realização da PCR.

Animais: O sedimento e/ou papa de hemáceas foi inoculado via intra-peritoneal em grupos de três (n=3) camundongos (0,2 mL/ animal) BALB/c em média com 30 dias de idade, (146 x 3) totalizando 594 animais. Durante o acompanhamento dos animais, o aparecimento de sinais clínicos, tais como pêlos arrepiados, emagrecimento e letargia, foram considerados como indicadores de infecção, sendo então realizado a lavagem peritoneal nestes animais à procura das formas taquizoítas. Os camundongos que não apresentaram sinais aparentes de infecção 30 dias pós-inóculo (PI) foram anestesiados (Éter Etílico P.A., CAAL), coletou-se o seu sangue por punção cardíaca e a seguir foram sacrificados (por deslocamento cervical) e posteriormente necropsiados. Realizou-se a sorologia experimental (n=594) para a detecção de anticorpos da classe IgG e IgM, por IFI. O encéfalo foi dividido em três partes: numa parte foi realizado o macerado e utilizado para o 2º inóculo em outro grupo de três (n=3) camundongos, sendo estes observados por mais 30 dias; outra parte foi fixada em álcool e posteriormente formolizada com o qual foram confeccionadas lâminas histológicas; a terceira parte foi congelada para a realização da PCR. O mesmo procedimento acima descrito foi utilizado com os camundongos do 2º inóculo (n=52).

Imunofluorescência Indireta: Para detecção dos anticorpos anti-*T. gondii* em soro de camundongos (n=146), usando lâminas comerciais (BIOSHOP®), pela técnica descrita por Camargo (1974). A IFI foi realizada com os soros em diluição seriada, a partir de 1:5 para detecção de IgM e IgG. Foi usado diluição de 1:200 para o conjugado anti-IgM e 1:300 anti-IgG (anti-cadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA®).

Histopatologia e Imuno-histoquímica: As lâminas para análise histopatológica e por imuno-histoquímica (n=146) foram confeccionadas de fragmentos de 5 mm do encéfalo de camundongos e fixadas em álcool 70% por 24h e transferidos para o formaldeído tamponado a 10%, desidratados em bateria crescente de álcool, diafanizados em xilol, impregnados e emblocados em parafina quente. Para a histopatologia, de cada encéfalo foram realizados cinco cortes seriados com 5 µm de espessura, corados pela HE (Junqueira, 1983). As lâminas para análise imunohistoquímica foram preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA). De cada encéfalo foram realizados dois cortes histológicos seriados com 3 µm de espessura, incubados com

anticorpos primários (Imunoglobulina policlonal de coelho anti - *T. gondii* DAKO) título 1/100 e anticorpos secundários (anti a espécie animal do anticorpo primário, marcado com biotina - DAKO) título de 1/100, seguido do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (DAKO). Revelou-se a reação com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA) 0,03% acrescida de 1,2mL de água oxigenada 3%. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina de Harris por 10 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA). Utilizamos como controles positivos cérebro e coração de camundongos infectados com a cepa ME49. As lâminas foram examinadas ao microscópio de luz (Olympus CX-31), com objetivas de 10, 40, e 100X.

Extração do DNA: De líquidos biológicos foi realizada segundo a técnica descrita por Gomes et al. (1998); em tecido sanguíneo com Cloreto de Amônia 170mM; em tecidos de camundongos com o Kit PureLink™ Genomic DNA Purification (Invitrogen).

Reação de Amplificação – PCR: Foram realizadas em um volume final de 25µL contendo 10mM TRIS HCl (pH 9,0), 3,5mM MgCl₂, 0,2U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 0,5mM de cada desoxinucleotídeos(dATP/ dTTP/ dGTP/ dCTP, Sigma Chemical Co., USA), 50pmoles de cada iniciador da reação (Invitrogen) e 2µL de DNA molde, à mistura da reação foram acrescentados 40µL de óleo mineral (Sigma Chemical Co. USA). As reações foram realizadas no termociclador MasterCycler Personal. O programa de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial a 94°C (5 min), 35 ciclos de desnaturação a 94°C (1 min), anelamento a 62°C (1 min) e extensão a 72°C (1 min) seguida de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os pares de primers utilizados foram: Toxo-T1 (5'-ATG GTC CGC CCG GTG TAT GAT ATG CGA T -3'), Toxo-T2 (5'-TCC CTA CGT GGT GCC GCA GTT CCT -3') e Toxo-B5 (5'-TGA AGA GAG GAA ACA GGT GGT CG-3'), Toxo-B6 (5'-CCG CCT CCT TCG TCC GTC GTA-3') Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% revelados pela prata (Santos et al. 1993). O LP, sangue e tecidos de camundongos infectados com a cepa RH foram utilizados como controle positivo.

RESULTADOS: Inoculação em camundongo: Não foi possível isolar o parasito, através da inoculação em camundongos, de nenhuma das 146 amostras obtidas (n=0).

IFI Experimental: De 146 amostras, 52 amostras (n=52) apresentaram títulos que variaram de 1:5 a 1:40 para IgG e/ou IgM. Devido aos resultados negativos dos exames

parasitológicos complementares, foi adotado como ponto de corte 1:40, ou seja, títulos iguais ou inferiores a 1:40 são negativos. Assim todos os resultados da IFI foram considerados negativos (n=0).

PCR: 52 amostras foram analisadas em duplicata pela PCR. Utilizou-se os primers T1-T2 e B5-B6, estas amostras foram selecionadas por apresentarem, na sorologia experimental, títulos de 1:5 até 1:40 pela IFI. Não houve amplificação de nenhuma das 52 amostras (n=0) o que levou a não considerar a sorologia positiva para títulos iguais ou inferiores a 1:40. Para controle e maior confiabilidade de nossos dados, foi realizada a PCR em diferentes tecidos dos camundongos (encéfalo, pulmão coração, fígado, rins e baço), todos foram negativos (n=0) (Tabela 1).

Imuno-histoquímica e Histopatologia: Foi realizada nos encéfalos de todos os camundongos de primeiro inóculo das 146 amostras biológicas humanas e nos camundongos de 2º inóculo de 52 amostras, em nenhum corte histológico foram visualizadas formas císticas ou taquizoítas do parasito *T. gondii* (n=0) (Tabela 2).

Tabela 1: Resultados dos exames realizados em material de origem humana

Amostras de Origem	Qtde Amostras	Material Humano		
		IFI IgG/IgM	Inoculação	PCR
Sangue Materno	22	Positiva	Negativa	Negativa
Sangue Fetal	54	Positiva	Negativa	Negativa
Sangue RN	23	Positiva	Negativa	Negativa
LCR	9	Positiva	Negativa	Negativa
LA	38	Positiva	Negativa	Negativa
Total	146 (100%)	146 (100%)	146 (100%)	52 (36%)

RN- Recém-Nascido; LCR- Líquido CefaloRaquidiano; LA- Líquido Amniótico

Tabela 2: Resultados dos exames realizados em material de origem experimental

Amostras de Origem	Qtde Amostras	Material Humano		
		IFI IgG/IgM	Inoculação	PCR
Sangue Materno	22	Positiva	Negativa	Negativa
Sangue Fetal	54	Positiva	Negativa	Negativa
Sangue RN	23	Positiva	Negativa	Negativa
LCR	9	Positiva	Negativa	Negativa
LA	38	Positiva	Negativa	Negativa
Total	146 (100%)	146 (100%)	146 (100%)	52 (36%)

RN- Recém-Nascido; LCR- Líquido CefaloRaquidiano; LA- Líquido Amniótico

DISCUSSÃO: No Serviço de Referência do Hospital das Clínicas para o atendimento de gestantes com toxoplasmose aguda, utiliza-se como rotina de tratamento a espiramicina até o final da gestação ou até o diagnóstico de infecção fetal, quando se troca o esquema terapêutico por sulfadiazina associada à pirimetamina e ao ácido fólico. Essas drogas são administradas até o nascimento do filho (de forma gratuita) e podem interferir nos resultados dos testes laboratoriais parasitológicos utilizados no diagnóstico da infecção fetal que apresentam baixa sensibilidade, apesar de elevada especificidade.

Na mãe, é de suma importância a confirmação da infecção por técnicas parasitológicas, para se avaliar a carga parasitária circulante, a qual interfere na chance de transmissão vertical e na gravidade da mesma. Além disso, serve para a solução de casos de sorologia inconclusiva, inoculando-se o material suspeito por via intra-peritoneal (Camargo et al. 1989; Kawazoe, 2002; Frenkel, 1997; Beazley & Egermam, 1998; Montoya & Liesenfeld, 2004). Mas o tratamento imediato da gestante suspeita diminui a carga parasitária, tornando essa metodologia de baixa sensibilidade (Hohlfeld et al. 1990; Foulon et al. 1994).

Esse estudo não identificou o parasito em nenhuma das formas testadas para o seu isolamento, e em nenhum dos materiais suspeitos examinados (sangue materno, fetal, de recém-nascidos, líquido amniótico e líquido cefalorraquidiano). Esse fato pode ter acontecido devido ao tratamento continuado da gestante, isso porque os fatores que interferem na identificação parasitária por PCR que são o tipo de armazenamento das amostras e a falta de

estabilização da reação (pelo risco de degradação do DNA), e as técnicas de extração, como encontrados por outros autores (Aspinall et al. 2002; Pelloux et al. 1998) foram devidamente realizadas, sem que esse fato pudesse ter interferido nos resultados. Por outro lado, os métodos para remover os inibidores de DNA são muito importantes, pois o DNA do *T. gondii* está misturado ao DNA humano. Os métodos com digestão de tecidos com proteinase K podem digerir proteínas e as lavagens podem remover inibidores. Alguns laboratórios preferem à clássica extração fenol-clorofórmio enquanto outros utilizam kits comerciais. Pujol-Rique et al. (1999) e Nagy et al. (2006) compararam três métodos de extração para detecção de *T. gondii* não houve diferença entre elas. A PCR tem sido usada para detectar *T. gondii*, e apresenta alta sensibilidade e especificidade além de ser um método rápido (Yai et al. 2003). Vale ressaltar que constitui importante ferramenta no auxílio diagnóstico da toxoplasmose, mas que sua sensibilidade é dependente do par de primers utilizados, como da presença do parasito no material analisado. Os resultados negativos pela PCR relatam ausência de parasitos na circulação, pelo menos na amostra analisada, sendo esta amostra coletada somente uma vez e apenas um pequeno volume deste foi utilizado (200µL). Embora existam dificuldades na obtenção de deduções seguras acerca da efetividade clínica do tratamento da toxoplasmose humana, Silva (2006) mostrou que em 138 amostras biológicas obtidas de gestantes e recém-nascidos tratados apenas com espiramicina (3g/dia), obteve-se 50,4% (67/138) de positividade na sorologia (IFI) experimental, 33,8% (46/138) de positividade na histopatologia e foi possível isolar o parasito do exudato peritoneal em apenas 3,6% (5/138) das amostras. A terapêutica ministrada aos pacientes encaminhados ao Hospital das Clínicas/UFG foi a associação de três drogas: espiramicina ou sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico. Os baixos títulos de IgG encontrados nesse trabalho, considerados negativos pela confirmação por métodos parasitológicos complementares. Outros estudos são necessários para avaliar a produção de anticorpos em animais experimentais, especialmente em camundongos, infectados pelo *T. gondii* para determinar o ponto de corte considerado negativo. Vários estudos realizados em porcas (Garcia et al. 2006), em cadelas (Bresciani et al. 2001), e em camundongos e ovelhas (Silva & Langoni 2001), têm mostrado o aumento de anticorpos geralmente em torno do 15º dia da infecção. No entanto, como no nosso caso não havia carga parasitária identificável, talvez não tenha sido suficiente para causar infecção em camundongos, o que não afasta a possibilidade de ter ocorrido transmissão congênita.

Zenner et al. (1998) e Terra et al. (2004) mostraram que após a inoculação intraperitoneal de formas taquizoítas, estes foram encontrados primeiramente na cavidade peritoneal e depois em órgãos adjacentes, sendo disseminados pelo sangue para todo o organismo. Amostras de tecido animal tem revelado alta positividade em encéfalos, corroborando com os dados apontados na literatura, onde o *T. gondii* têm tropismo por tecido cerebral independente da via de inoculação administrada. Frequentemente a presença do parasito em pulmão, coração e fígado são observados em camundongos (Dubey 1997, 1998). Em nenhum dos cortes de encéfalo de camundongos corados pela imunohistoquímica (IH) e pela hematoxilina-eosina (HE) detectou-se a presença de taquizoítos ou cistos de *T. gondii*. Estes resultados podem estar associados ao fato das amostras analisadas serem provenientes de pacientes devidamente tratados e/ou com baixa parasitemia, além do pequeno número de cortes histológicos realizados. Rosa et al. (2001) através da HE e IH também não encontrou parasitos ou cistos de *T. gondii* em tecidos de caprinos experimentalmente inoculados, somente alterações inflamatórias e degenerativas foram observadas e consideradas inespecíficas. Já Uggla et al. (1987) e Viotti et al. (1995) observaram a presença do *T. gondii* e seus antígenos, respectivamente, nos tecidos de ovinos e suínos experimentalmente inoculados, mostrando a diversidade de resultados nas várias pesquisas. Deve-se considerar também as vias de inoculação e a forma infectante utilizadas, a espécie do hospedeiro e a imunogenicidade da cepa que podem influir na dinâmica da infecção, bem como na distribuição aleatória do agente nos diferentes tecidos do hospedeiro. Outro fato importante segundo Dubey (1998), é que os cistos podem apresentar-se em quantidade menor do que 01 cisto/50g de tecidos e, histologicamente este é um limite baixo para a detecção do *T. gondii*. Outros autores como Held et al. (2000), mostraram que em pacientes transplantados, a imuno-histoquímica pode ser usada para detectar *T. gondii* em vários tecidos e quando associada à PCR a positividade foi de 90%.

Apesar de a sorologia ser eficaz em 89,5% nas grávidas (Denmark & Chessum, 1978; Sounis, 1979; Pratlong et al. 1994; Camargo, 1995), há inespecificidade, quando se refere à confirmação da infecção no feto e/ou recém nascido devido à influência da imaturidade imunológica (Braga & Passerine, 1994). O acompanhamento das gestantes por métodos parasitológicos demonstra suma importância para a monitorização e validação do tratamento, porém outros estudos são necessários para definir quanto tempo após o início do tratamento, e a partir de qual dosagem o diagnóstico parasitológico torna-se negativo. A prevenção da

toxoplasmose congênita é de fundamental importância para um melhor controle da infecção evitando as graves seqüelas que podem ocorrer ao feto e RN.

Todos os métodos de diagnósticos parasitológicos utilizados foram negativos, não sendo possível detectar parasitos nas amostras analisadas. Este dado permite inferir que a ausência e/ou uma significativa diminuição dos parasitos circulantes, aconteceu devido ao tratamento específico utilizado no pré-natal, mostrando sua eficiência. Reforçamos a necessidade de acompanhamento das gestantes de risco, com intervenção terapêutica sempre que a infecção ativa for detectada, melhorando assim o prognóstico da infecção fetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amendoeira MRR, Da Costa T, Spalding SM 1999. *T. gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. Rev Souza Marques 1 (1): 15-35.
2. Aspinall TV, Marlee D, Hyde JE, Sims PFG 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction—food for thought. International Journal of Parasitology 32: 1193–1199.
3. Avelino MM, Campos Jr D, Parada JCB, Castro AM 2003. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology 108 (1) May: 19-24.
4. Beazley DM, Egerman RS 1998. Toxoplasmosis. Semin. Perinatol. 22 (4): 332-338.
5. Braga LFCO, Passerine IGA 1994. Cordocentese. Ginecol. Obstet. Atual. 3 (6): 99-112.
6. Bresciani KDS, Toniollo GH, Costa AJ, Sabatini GA, Moraes FR 2001. Toxoplasmose experimental em cadelas gestantes – observações clínicas, parasitológicas e obstétricas. Cienc. Rural Santa Maria Nov/Dez 31: 6.
7. Camargo ME 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev Brasileira de Patologia Clínica 10: 87-107.
8. Camargo ME, Moura MEG, Leser PG 1989. Toxoplasmosis serology: an efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. Rev Inst. Med. Trop 31:279-285.
9. Camargo ME 1995. Alguns aspectos atuais do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose. Anais da Academia Nacional Medicina 155: 236-239.

10. Denmark JR, Chessum BS 1978. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and detection of *Toxoplasma* antibody. *Medical Laboratory Science* 35: 227-232.
11. Dubey JP 1997. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: A comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitology* 115: 15-20.
12. Dubey JP 1998. Reevaluation of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitology* 74: 75-77.
13. Foulon W, Naessens A, Derde MP 1994. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *Am J Prenatal* 11: 57-62.
14. Frenkel JK 1997. Toxoplasmosis. In: Veronesi R, Focaccia R, editors. *Tratado de infectologia*. 2ed. São Paulo: Atheneu: p.1290-1305.
15. Garcia JL, Gennari SM, Machado RZ, Navarro IT 2006. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *Experimental Parasitology* 113: 267-271.
16. Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Galvão LMC, Chiari E 1998. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of Polymerase Chain Reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 88: 28-33.
17. Held TK et al 2000. Diagnosis of toxoplasmosis in bone marrow transplant recipients: comparison of PCR-based results and immunohistochemistry. *Bone Marrow Transplantation* 25: 1257-1262.
18. Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P, et al. 1990. Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *J Pediatr* 115: 765-769.

19. Kawazoe U 2002. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. Parasitologia Humana. 10 ed., São Paulo, Atheneu: p. 149-156.
20. Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. Lancet 363: 1965-1976.
21. Nagy B, Ban Z, Beke A, Nagy GR, Lázár L, Papp C, Tóth-Pál E, Papp Z 2006. Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. Clinica Chimica Acta 368: 131-137.
22. Pelloux H, Guy E, Angelici MC et al 1998. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, including 15 teams. FEMS Microbiol. Lett. 165: 231-237.
23. Pratlong F, Boulot P, Isert E 1994. Fetal diagnosis of toxoplasmosis in 190 women infected during pregnancy. Prenat Diagn 14: 191-198.
24. Pujol-Rique M, Derouin F, Garcia-Quintanilla A, Valls ME, Miro JM, Jimenez de Anta MT 1999. Design of a one-tube hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. J Med Microbiol 48: 857-862.
25. Rey L 1991. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. Parasitologia. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.:p. 274-285.
26. Rosa C et al. 2001. Comparação das técnicas de imuno-histoquímica e bioensaios em camundongos para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. Arq. Inst. Biol., São Paulo 68 (1): 13-17.
27. Santos FR, Pena SDJ, Eppelen JT 1993. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. Hum Genet 90: 655-656.

28. Silva AV, Langoni H 2001. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Veterinary Parasitology* 97: 191-198.
29. Silva MG 2006. Otimização do diagnóstico parasitológico da toxoplasmose congênita e análise histopatológica encefálica experimental. [Dissertação de Mestrado]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás.
30. Sounis E 1979. Bioestatística, 2.ed. Ver. McGraw-Hill do Brasil, Ltda.
31. Terra MABL, Bello AR, Bastos OM, Amendoeira MRR, Coelho JMCO, Ferreira LF, Araújo A 2004. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by polymerase chain reaction in experimentally desiccated tissues. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* jan/mar 99: 2.
32. Ugglá, A, Sjoland L, Dubey JP 1987. Immunohistochemical diagnosis to toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. *Am. J. Vet. Res* 48 (3): 348-351.
33. Viotti NMA, Freire RL, Navarro LT, Vidotto O 1995. Avaliação das técnicas de Hematoxilina Eosina, imunofluorescência e peroxidase anti-peroxidase no diagnóstico post-mortem da toxoplasmose suína. *Semina Cienc. Agric* 16 (1): 107-114.
34. Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J, Fleury J, Quantin C et al. 2004. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* 113 (6): 1567-1572.
35. Wong SY, Remington JS 1993. Biology of *T. gondii*. *AIDS* 7 (3): 299-316.
36. Wong SY, Remington JS 1994. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clinical Infectious Diseases* 18: 853-862.
37. Yai LEO, Vianna MCB, Soares RM, Cortez A, Freire RL, Richtzenhain LJ, Gennari SM 2003. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux,

1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 40: 227-234.

38. Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF 1998. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp Parasitol* 90: 86-94.

4.3 Short communication:

TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DO *T. gondii* PELO ALEITAMENTO MATERNO

**Tatiane Luiza da Costa¹, Mariza Martins Avelino², Waldemar Amaral³,
Ana Maria de Castro⁴**

(1) Mestranda em Medicina Tropical na área de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública IPTSP-UFG. (2) Prof^a. Adjunto do Departamento de Pediatria e Puericultura da Faculdade de Medicina da UFG. (3) Prof. Adjunto do Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina da UFG (4) Prof^a. Adjunto da Disciplina de Parasitologia e, orientadora desse estudo dentro do PPGMT no IPTSP-UFG.

Laboratório de Biologia, Fisiologia e Imunologia de Protozoários de Interesse Humano do IPTSP-UFG. Rua 235 esq/ 1^a. av. s/n Setor Leste Universitário, Goiânia Goiás –74605-050.

Autor de correspondência:

Profa. Dra. Ana Maria de Castro
amaria@iptsp.ufg.br

Laboratório de Biologia, Fisiologia e Imunologia de Protozoários de Interesse Humano do DMIPP/IPTSP-UFG.

Rua 235 esq/ 1^a. av. s/n Setor Leste Universitário, Goiânia Goiás –74605-050.

Fone: (62) 3521-1840 Fax: (62) 3521-1837

RESUMO:

Com o objetivo de Avaliar experimentalmente a transmissão do *T. gondii* pelo aleitamento materno, realizou-se a inoculação dos Isolados 3, 15 e 20 de *T. gondii* em grupos de camundongos fêmeas 15 dias após o parto, na concentração de 1×10^3 /mL. De oito fêmeas, obteve-se 24 filhotes, estes foram observados por 60 dias, sendo sacrificados e sangue coletado para a imunofluorescência indireta (IFI). 17% (4/24) dos filhotes apresentaram positividade parasitária no lavado peritoneal, confirmando o potencial do leite materno como possível fonte de infecção toxoplásmica aguda, quando a mãe está na fase aguda do processo infeccioso.

Palavras-Chave: Toxoplasmose, *T. gondii*, transmissão congênita.

SUMMARY:

Aiming the experimental evaluation of breastfeeding as an important infection pathway of *T. gondii*, the inoculation of *T. gondii* 3, 15 and 20 isolates was performed in groups of female mice 15 days after labor, in 1×10^3 /mL concentration. From eight females, 24 breeding were obtained which were observed through 60 days, after that they were euthanized and their blood was collected to indirect immunofluorescenc (IFI) exam. In 17% (4/24) inbreed showed positivity in the peritoneal washing. This study demonstrated and confirmed the potential of breastfeeding as source of acute toxoplasmosis infection, when the pregnant is in acute phase the disease.

Key words: Toxoplasmosis, *T. gondii*, congenital transmission.

Introdução: Habitualmente, a toxoplasmose se transmite ao feto durante a primo-infecção materna, outros autores também descrevem a transmissão congênita em filhos de mulheres que tiveram a infecção antes da concepção e reagudizam a infecção (Pons et al. 1995). Além disso, a toxoplasmose é indicada como principal causa de abortamento de repetição (Gomes et al. 1978). Estes fatores convergem à atenção ao período gestacional, e ao recém nascido, porém faltam dados sobre o seguimento dos recém nascidos durante o período de aleitamento. O leite foi sugerido como causa de infecção pelo *T. gondii* em muitos casos. A toxoplasmose foi descrita em muitas crianças que amamentavam em mães recentemente infectadas com *T. gondii* através da ingestão de leite de cabra não pasteurizado, sendo considerado uma possível fonte de infecção do *T. gondii* em crianças de área rural (Riemann et al. 1975; Chiari et al. 1984; Skinner et al. 1990). Taquizoítas tem sido encontrado em muitas espécies animais incluindo ovelhas, cabras, vacas e camundongos (Dubey, 1998; Pettersen, 1984; Tenter et al. 2000). Também tem sido demonstrada a infecção oral pelo *T. gondii* em gatos e camundongos, além da infecção dos filhotes pela ingestão de leite nestas espécies (Dubey, 1998). Roberts & Alexander (1992) demonstraram a transmissão vertical da toxoplasmose em camundongos BALB/c infectados com *T. gondii* durante a gravidez.

Objetivo: Avaliar experimentalmente a transmissão do *T. gondii* pelo aleitamento materno;

Metodologia: Realizou-se a inoculação via intraperitoneal (IP) dos Isolados-3, Isolado-15 e Isolado-20, em três grupos de três camundongos BALB/c fêmeas (n=9) 15 dias após o parto, e de cada isolado inoculou-se parasitos na concentração de 1×10^3 /mL. De oito fêmeas (pois uma morreu), obteve-se 24 filhotes mantidos em gaiolas separadas, sendo estas trocadas duas vezes ao dia. Os filhotes foram observados diariamente, quanto a aspectos clínicos (letargia, pêlos arrepiados e diminuição do peso) e mortalidade, por até 60 dias pós-inóculo (PI). Após, foram anestesiados (Éter Etílico P.A., CAAL), sacrificados (por deslocamento cervical) e o sangue coletado por punção cardíaca para comprovação sorológica da infecção através da Imunofluorescência Indireta (IFI). Como grupo controle utilizou-se um camundongo grávida saudável e 20 dias pós-parto seus filhotes (n=5) foram mantidos em gaiolas separadas. Estes seguiram o mesmo protocolo. A IFI foi realizada para detecção dos anticorpos anti-*T. gondii*. em soro de camundongos (n=5), usando lâminas comerciais (BIOSHOP[®]), pela técnica descrita por Camargo (1974). Os soros foram diluídos em série a partir de 1:10 para detecção de IgM e IgG. Foi usado diluição de 1:200 para o conjugado anti-IgM e 1:300 anti-IgG (Anti-cadeia pesada com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA[®]).

Resultados: Os camundongos fêmeas (mães) morreram com média de 07 dias PI. Dos 24 filhotes nascidos, 21% (5/24) chegaram aos 60 dias de vida, tiveram o sangue retirado para confirmação sorológica, onde pela IFI os resultados foram negativos; 12,5% (3) chegaram ao 14º dia de vida apresentando baixo peso, pêlos arrepiados e letargia, e não foi possível realizar a IFI. 37,5% (9) morreram no 5º, 7º e 8º dia, 8% (2) morreram no 6º e 9º dia, e 21% (5/24) morreu no 4º dia de vida. Apesar de não ter comprovação sorológica, todos os filhotes apresentaram sintomatologia característica (baixo peso, pêlos arrepiados e letargia). No período de realização deste trabalho, o desmame dos filhotes mantidos no biotério se dava aos 30 dias de vida. Os camundongos mães foram infectados com *T. gondii* 15 dias pós-parto e morreram com média de 07 dias PI, sendo assim, o desmame dos filhotes se deu aos 22 dias de vida. O grupo controle apresentou bom desenvolvimento e todos sobreviveram até o 60º dia pós-parto, tendo a sorologia negativa para *T.gondii*, mostrando que a sintomatologia apresentada pelos filhotes não foi causada por desnutrição. Não foi possível a confirmação pela PCR, devido o estado de putrefação em que os filhotes foram encontrados. Em 17% (4/24) dos filhotes foi possível comprovar a infecção pela presença de taquizoítas do *T. gondii* no lavado peritoneal. (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição da sobrevivência de 24 filhotes de camundongos sob risco de infecção oral pelo *Toxoplasma gondii*.

Nr. Filhotes	Sobrevivida/ Dias	Porcentagem	IFI IgG/IgM	LP
5	60	21%	Negativo	NR
3	14	12,50%	NR	NR
1	9	4%	NR	NR
3	8	12,50%	NR	Positivo
3	7	12,50%	NR	NR
1	6	4%	NR	Positivo
3	5	12,50%	NR	NR
5	4	21%	NR	NR
Total 24		100%		

LP- Lavado Peritoneal; NR- Não realizado

Discussão: Os resultados desse estudo mostraram que o leite materno é uma importante fonte de transmissão do *T. gondii* (17%), quando a mãe encontra-se na fase aguda do processo infeccioso, corroborando com dados da literatura. Um fator de risco relevante para a infecção toxoplásmica aguda é o contato com líquidos corporais orgânicos, em especial o leite materno, de indivíduos na fase ativa da doença. Bresciani et al. (2001) demonstraram em cadelas prenhas infectadas com *T. gondii* sinais clínicos e sorológicos característicos da doença como já descrito por Vidotto & Costa (1987). Dubey et al. (1995), sugerem que a lactação transmite o *T. gondii* em gatos jovens. Powell et al. (2001) demonstraram pela PCR que o *T. gondii* pode ser encontrado em leite de gatas experimentalmente infectadas. Hiramoto et al. (2001) demonstraram a infecciosidade de cistos de *T. gondii* em leite de vaca sob refrigeração a 4°C por até 20 dias e que os cistos resistiram até mesmo ao processo de fabricação de queijos. Esses estudos confirmam o potencial da transmissão do *T. gondii* pelo leite, e provavelmente em outros líquidos orgânicos, urina e saliva, como foi observado em ovelhas por Vitor & Pinto (1991). As medidas de prevenção primária indicadas à gestante de risco (soronegativas) devem continuar sendo enfatizadas às nutrizes, pela possibilidade da mulher adquirir a toxoplasmose aguda e assim contaminar o filho através da amamentação.

CONCLUSÃO: O leite materno é uma possível via de infecção do *T. gondii*. Assim, há necessidade de acompanhamento dos filhos de mulheres de risco durante o período de amamentação, e das mulheres, para evitarem as fontes de contaminação com o protozoário.

BIBLIOGRAFIA.

- 1- Bresciani KDS, Toniollo GH, Costa AJ, Sabatini GA, Moraes FR 2001. Toxoplasmose experimental em cadelas gestantes – observações clínicas, parasitológicas e obstétricas. Cienc. Rural Santa Maria Nov/Dez 31: 6.
- 2- Camargo ME 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev Brasileira de Patologia Clínica 10: 87-107.

- 3- Chiari CA, Neves DP 1997. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 337-340.
- 4- Dubey JP 1995. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. J. Parasitol. 81: 410–415.
- 5- Dubey JP 1998. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. J. Parasitol. 116: 43–50.
- 6- Gomes UA, et al 1978. Estudio de las relaciones entre a toxoplasmosis y las perdas fetales. Bol of Sanit Panam, Whashington 85 (4): 315-324.
- 7- Hiramoto RM et al. 2001. Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. Rev Saúde Pública 35 (2): 113-118.
- 8- Pettersen EK 1984. Transmission of toxoplasmosis via milk from lactating mice. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 92 [B]: 175–176.
- 9- Pons JC, Sigrand C, Grangeot-Keros L et al 1995. Congenital toxoplasmosis to fetus of a pré-pregnancy maternal infection. Press Med, Paris 3 (24): 179-182.
- 10- Powell CC, Brewer M, Lappin MR 2001. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. Veterinary Parasitology 102: 29-33.
- 11- Riemann HP, Meyer ME, Theis JH, Kelso G, Behymer DE 1975. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. J Pediatr 87: 573-576.
- 12- Roberts CW, Alexander J 1992. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first times during pregnancy. Parasitology 104: 19-23.

- 13- Skinner LJ, Timperley AC, Wightman D, Chatterton JM, Ho-Yen DO 1990. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. *Scand. J. Infect. Dis* 22: 359–361.
- 14- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30: 1217–1258.
- 15- Vidotto O, Costa AJ 1987. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. Observações clínicas e hematológicas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 39: 623-639.
- 16- Vitor RWA, Pinto JB 1991. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 42 (2): 147-154.

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos parasitológicos experimentais apresentaram baixa sensibilidade devido ao tratamento prévio dos pacientes e/ou á baixa virulência das cepas, dificultando a detecção da parasitemia experimental das amostras analisadas, melhorando assim o prognóstico da infecção fetal.

Os estoques isolados de sangue periférico de recém-nascido (I-3), líquido amniótico (I-15) e sangue fetal (I-20), mostraram-se altamente virulentos mesmo com inóculo de baixo número de parasitos, tendo comportamento semelhante ao da cepa controle RH, sendo necessário a genotipagem destes isolados.

Os camundongos BALB/c mostraram-se um modelo experimental satisfatório à infecção pelo *T. gondii*, enquanto as linhagens BALB/xid e Swiss demonstraram maior resistência.

O diagnóstico da toxoplasmose congênita pode ser realizado através da PCR utilizando os pares de primers T1-T2 que mostraram uma sensibilidade maior que B5-B6, para detecção de parasitos do *T. gondii* em líquidos biológicos como, lavado peritoneal e sangue.

A transmissão da toxoplasmose através do aleitamento materno foi confirmada em camundongos BALB/c, a fase aguda da doença, mostrando que os líquidos corporais orgânicos, em especial o leite materno, são importante via de infecção toxoplásmica.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Amato NV, Servolo MEA, Levi GC, Seixas DMI 1995. Toxoplasmose. 4.ed. São Paulo: Sarvier.
- 2- Amato NV, Marchi CR 2002. Toxoplasmose. In: Cimerman B & Cimerman S, editors. Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 160-177.
- 3- Araújo FG 1970. Anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue. Rev Inst Med Trop São Paulo 12: 105-111.
- 4- Aspöck H, Pollak A 1992. Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. Scand. J. Infect Dis 84 (Suppl): 32-37.
- 5- Avelino MM 2000. A gestação como fator de risco para a primo-infecção pelo *Toxoplasma gondii* [Tese Doutorado em Medicina].Brasília: Universidade de Brasília; 271 p.
- 6- Avelino MM, Campos JrD, Parada JB, Castro AM 2003. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology May 108(1): 19-24.
- 7- Bastien P 2002. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 96: 205–215.
- 8- Bearman MH, McCabe RE, Wong Sin-Yew, Remington JS 1996. *T.gondii*. In: Mandell D B, editor. Principles and practice of infectious diseases. 4 ed., New York: Churchill Livingstone: 2455-2475.

- 9- Bichara CNC 2001. Perfil epidemiológico da toxoplasmose humana na área metropolitana de Belém/PA: a experiência no serviço de parasitologia do Instituto Evandro Chagas [Dissertação de Mestrado]. Belém: Universidade Federal do Pará.
- 10- Boothroyd JC, Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 141: 3584–3591.
- 11- Boyer KM, Remington JS, MacLeod RL 1998. Toxoplasmosis. In: Feigin and Cherry, editors. Textbook of Pediatric Infectious Diseases Philadelphia: WB Saunders Company; 2473-90.
- 12- Brezin AP et al. 1994. Ocular toxoplasmosis in the fetus: immunohistochemistry analysis and DNA amplification. Retina 14: 19-26.
- 13- Brisighelli NA 1998. Prevalência da Toxoplasmose em gestantes da cidade de Bragança Paulista - São Paulo [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
- 14- Buchinder S, Blatz R, Rodloff AC 2003. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. Diagn Microbiol Infect Dis 45:269-271.
- 15- Burg JL, Grover CM, Poutetty P, Boothroyd JC 1989. Direct and sensitive detection of pathogenic protozoa, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol 27: 1787-1792.
- 16- Caiaffa W et al., 1993. Toxoplasmosis and mental retardation. Report of a case-control study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 88: 253-261.
- 17- Calvão AD 2002. Manifestações oftalmológicas na toxoplasmose congênita [Monografia, curso de medicina]. Niterói: Universidade Federal Fluminense.

- 18- Camargo ME, Leser PG, Rocca A 1972. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-Toxoplasma fluorescentes testes. A technique for specific results. Rev Inst Med Trop São Paulo 14: 310-313.
- 19- Camargo ME, Leser PG, Guarnieri DB, Rocca A 1977. Padronização de testes sorológicos para toxoplasmose, problema urgente da patologia clínica. Ver. Brás. Patol. Clin 13:1-5.
- 20- Camargo ME, Moura MEG, Leser PG 1989. Toxoplasmosis serology: an efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. Rev Inst. Med. Trop 31: 279-285.
- 21- Camargo ME, Silva SM, Leser PG, Granato CH 1991. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. Ver Inst Med Trop São Paulo 33:213-218.
- 22- Camargo ME 1995. Alguns aspectos atuais do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose. Anais da Academia Nacional Medicina 155: 236-239.
- 23- Camargo ME 2001. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editors. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 278-286.
- 24- Carmo EL, Póvoa MM, Trindade DB, Machador LD, Mesquita MPM 1997. Levantamento da prevalência de *T. gondii*; através de diferentes métodos sorológicos, em um grupo de grávidas e crianças (0-2 anos) da cidade de Belém/PA. In: 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia ; Salvador. Anais. Salvador:[s.n.]; p. 107.
- 25- Ceccon MEJ et al., 1997. Imunidade do feto e do recém-nascido. Pediatria, São Paulo 19: 9-23.

- 26- Chumpitazi BFP, Boussaid A, Pelloux H, et al. 1995. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. *J. Clin. Microbiol* 33: 1479-1485.
- 27- Conley FK, Jenkins KA, Remington JS 2001. *Toxoplasma*. Rosa C. et al., editors. 16. ed. *Arq. Inst. Biol São Paulo* Jan/Jun 68(1): 13-17.
- 28- Contreras MD, Sandoval ML, Salinas P, Muñoz P, Vargas S 2000. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG/IgM/IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y crônica. *Bol Chil. Parasitol* 55(1/2): 1-10.
- 29- Couvreur J, Nottin N, Desmonts G 1980. La toxoplasmosis congénitale traitée. Resultats cliniques et biologiques. *Ann Pediatr* 27: 647-662.
- 30- Couvreur J, Desmonts G, Tournier G, Szusterkac M 1984. Etude d'une serie homogène de 210 cas de toxoplasmosis congénitale chez des nourissons ages de 0 a 11 mois et déspités de facon prospective. *Ann. Pédiatr* 31: 815-819.
- 31- Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M et al. 1988. Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N Engl J Med* 318 (5): 271-275.
- 32- Davidson MG, Lapin MR, English RV, Tompkins MB 1993. A feline model of ocular toxoplasmosis. *Invest. Ophthalmol. Svisual Sci.* 12 (34): 3653-3660.
- 33- De Vroede M, Dodion J, De Menter F, Piepsz A, Verougstraete C 1979. Congenital toxoplasmosis: late appearance of retinal lesions after treatment. *Acta Pediatr Scand* 68: 767-772.
- 34- Decoster A, Darcy F, Caron A 1992. Anti P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital toxoplasma infection. *Clin. Exp. Immunol* 87: 310-315.

- 35- Denmark JR, Chessum BS 1978. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and detection of *Toxoplasma* antibody. *Medical Laboratory Science* 35: 227-232.
- 36- Derourin F, Mazon MC, Garin YJF 1987. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 25(9):1597-1600.
- 37- Desmonts G, Couvreur J, Alison F, Baudelot J, Gerbeaux J, Lelong M 1965. Etude épidémiologique sur la toxoplasmose: de Influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de infection humaine. *Revist Francésè Etudle Clinique Biologie* 10: 952-958.
- 38- Desmonts G, Couvreur J 1974. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. *The New England Journal of Medicine* 290: 1110-1116.
- 39- Desmonts G, Naot Y, Remington JS 1981. Immunoglobulin M-immunsorbent agglutination assay for diagnosis of infectious disease: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J Clin Microbiol* 14: 486.
- 40- Desmonts G, Forestier F, Thulliez PH et al. 1990. Preventing congenital toxoplasmosis. *Lancet, Paris* 336 (20): 1017-1018.
- 41- Diniz EMAY; Costa FAC 2003. Qual é a recomendação atual para o tratamento da toxoplasmose congênita? *Rev. Assoc. Med. Bras.* 49 (1): 10.
- 42- Dubey JP, Frenkel JK 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of toxoplasma cysts. *J Protozool* 23: 537-554.
- 43- Dubey JP, Lin TL 1994. Acute toxoplasmosis in a gray fox (*Urocyon cenereargenteus*). *Vet. Parasitol* 3/4 (51): 321-325.

- 44- Dubey JP 1998. Reevaluation of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitology* 74: 75-77.
- 45- Duffy K, Wharton PJ, Johnson J, New L, Holliman RE 1989. Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting *Toxoplasma* specific IgM. *Journal of Clinical Pathology* 42: 1291-1295.
- 46- Eichenwald HF 1959. A study of congenital toxoplasmosis with particular emphasis on clinical manifestations, sequelae and therapy. In: Slim JC. Human toxoplasmosis. Copenhagen: Munhsgaard. v.2.
- 47- Ellis JT 1998. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 28: 1053-1060.
- 48- Falangola MF, Petito CK 1993. Choroid plexus infection in cerebral toxoplasmosis in AIDS patients. *Neurology* 10 (43): 2035-2040.
- 49- Feldman HÁ, Miller LT 1956. Serological study of toxoplasmosis prevalence. *Am J Hyg* 64: 320-335.
- 50- Ferreira WA 2001. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.278-288.
- 51- Foudrinier F, Marx-Chemela C, Aubert D, et al. 1995. Value of specific immunoglobulin A detection by two immunecapture assays in the diagnosis of toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*14: 585-590.
- 52- Foulon W 1992. Congenital toxoplasmosis: is screening desirable? *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 84 (Suppl.): 11-17.
- 53- Foulon W, Naessens A, Derde MP 1994. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *Am J Prenatal.* 11: 57-62.

- 54- Frenkel JR, Dubey JO, Miller NL 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science 167: 893-896.
- 55- Frenkel JK, Ruiz A, Chinchilla M 1975. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 24: 439-443.
- 56- Gandilhon F, Peyle L, Wallon M, et al. 1994. Value of specific IgA assay on cord blood for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Serodiagn. Immunother. Infect. Dis. 6: 17-20.
- 57- Garcia APG 1979. Congenital toxoplasmosis in two successive sibs. Arch Dis Child 43: 705-709.
- 58- Gomes UA, et al. 1978. Estudio de las relaciones entre a toxoplasmosis y las perdas fetales. Bol of Sanit Panam, Whashington 85 (4): 315-324.
- 59- Gross U, Roos T, Appoldt D, Heeseman J 1992. Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies agains P30 by using the immunoblot technique. J Clin Microbiol 30 (6): 1436-1441.
- 60- Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC 1990. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymease chain reaction and amniotic fluid. Journal of Clinical Microbiology 28 (10): 2297-2301.
- 61- Guerina NG, Hsu HW Meissner HC, Maguire JH, Linfield R, Stechenberg B, et al. 1994. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplama gondii* infection: The New England Regional *Toxoplasma* Working Group. N. Engl J Med 330: 1858-1863.
- 62- Hall SM 1992. Congenital Toxoplasmosis [Review]. BMJ 305: 291-297.

- 63- Hinrichsen SL, Valente A, et al. 2005. Toxoplasmose. In: Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.421-427.
- 64- Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P et al. 1990. Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. J Pediatr 115: 765-769.
- 65- Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M 1994. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. N Engl J Med 331: 695-699.
- 66- Ho-Yen DO et al. 1992. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. J Clin Pathol 45: 910-913.
- 67- Hutchinson WM 1965. Experimental transmission of *T. gondii*. Nature 206 (4987): 961-962.
- 68- Hutchinson WM, Dunachie JF, Siim JC, Work K 1970. Coccidian like nature of *T. gondii*. Brit Med J 1:142.
- 69- Israelki DM, Remington JS 1988. Encefalite toxoplásmica em pacientes com AIDS. Clin Doenças Infec Parasit Amer Norte 2: 451-469.
- 70- Jacobs L, Lunde M 1957. A hemagglutination test for toxoplasmosis. J Parasitol. 43: 308-314.
- 71- Jacobs L, Remington JS, Melton ML 1960. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 46: 11-21.
- 72- James GS 1996. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *T. gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. J Clin Microbiol 34 (6): 1572-1575.

- 73- Joynson DH, Payne RA, Rawal BK 1990. Potencial role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. J Clin Pathol 43: 1032-1033.
- 74- Kaniak CEA 1991. Toxoplasmose congênita: estudo da forma inaparente em Brasília-DF [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. 77p.
- 75- Kawazoe U 2002. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. Parasitologia Humana. 10 ed. São Paulo: Atheneu. p. 149-156.
- 76- Khalifa KES, Roth A, Roth B et al. 1994. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. J Clin Microbiol 32: 2813–2819.
- 77- Kompalic-Cristo A 2004. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 98 (2): 92-95.
- 78- Koppe JB, Loewer-Sieger DH 1986. Results of 20-years follow-up of congenital toxoplasmosis. Lancet 8475 (1): 254-256.
- 79- Lappalainen M, Koskela P, Hedman K 1992. Incidence of primary *Toxoplasma* infections during pregnancy in southern Finland: a prospective cohort study. Scand J Infect Dis 24 (1): 97-104.
- 80- Lebech M, Joynson DH, Seitz HM 1996. Classification system and case definition of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 15: 799-805.
- 81- Leport C, Vilde JL, Katlama C et al. 1986. Failure of spiramycin to prevent neurotoxoplasmosis in immunosuppressed patients. JAMA 255: 2290.
- 82- Manual de Instruções de Uso do Sistema AXSYM Toxo IgG e IgM 2000, produzido por Abbott Laboratories ; Estados Unidos.

- 83- Manual de Instruções de Uso do Sistema VIDAS Toxo IgM 1998, produzido por Bio-Merieux, S.A.; França.
- 84- McAuley J, Boyer KM, Patel D et al. 1994. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: The Chicago Collaborative Treatment Trial. Clin Infect Dis 18: 38-72.
- 85- McCabe R, Remington JS 1988. Toxoplasmosis: The time has come. [Editorial]. N Engl J Med 318: 313-315.
- 86- Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. Lancet 363: 1965-1976.
- 87- Naspitz CK 1985. Mecanismos de defesa do recém-nascido. In: Farrhat e Kopelman, editors. Infecções Perinatais. Rio de Janeiro: Atheneu. p.3-8.
- 88- Neto, AV; Mendonça, JS 1982. Orientação para o tratamento da toxoplasmose. Pediat. (São Paulo) 4: 51-53.
- 89- Neves JM, Nascimento LB, Ramos JGL, Martins-Costa SH 1994. Toxoplasmose na gestação. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia 16 (6): 197-202.
- 90- Neves DP 2001. Parasitologia Humana. 10 ed., Atheneu; São Paulo. p. 147-156.
- 91- Nóbrega MC 1998. Ocorrência de toxoplasmose em gestantes e em seus recém-nascidos, atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE [Dissertação de Mestrado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco.
- 92- Pedreira DAL 1995. Contribuição ao estudo da toxoplasmose congênita [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade da Medicina, Universidade de São Paulo.
- 93- Pelloux H, et al. 1996. A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett 138: 11-15.

- 94- Philocreon GR 1976. Toxoplasmose e gravidez: inquérito clínico-epidemiológico em gestantes de Goiânia [Tese de Doutorado].Goiânia: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás. p.121.
- 95- Pinkerton H, Weinman D 1940. Toxoplasma infection in man. Arch Pathol, St. Louis 30: 374.
- 96- Pinon, JM, Thoanes H, Gruson N 1985. An enzyme-linked immunofiltration assay used to compare and maternal antibody profiles in toxoplasmosis. J Immunol Methods Paris 77: 15-23.
- 97- Pons JC, Sigrand C, Grangeot-Keros L et al. 1995. Congenital toxoplasmosis to fetus of a pré-pregnancy maternal infection. Press Med Paris 3 (24): 179-182.
- 98- Remington JS, Cavanaugh EM 1965. Isolation of the encysted form of *T. gondii* from human skeletal muscles and brain. N Engl J Med 273: 1308-1310.
- 99- Remington JS, Macleod R, Desmonts G 1994. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J. Infectious diseases of the new-fetus and born infant. 4. ed. Philadelphia: WB Saunders.
- 100- Remington JS, Macleod R, Desmonts G 1995. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J. Infectious diseases of the new-fetus and born infant. 4. ed. Philadelphia: WB Saunders. p.140-267.
- 101- Remington JS, Mcleod R, Thulliez P, Desmonts G 2001. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases in the fetus and newborn infant. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. p.205-346.
- 102- Remington JS, Thulliez P, Montoya JG 2004. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol 42: 941-945.

- 103- Rey L 1991. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. Parasitologia. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. p. 274-285.
- 104- Roos T, Martius J, Gross U, Schrod L 1993. Systematic serologic screening for toxoplasmosis in pregnancy: is it possible to simplify the diagnostic procedures? J Gynecol Obstet Biol Reprod 22: 277-283.
- 105- Rosa C, Kasail N, Souza SLP, Guerra JL, Rego AA, Gennari SM 2001. Comparação das técnicas de imuno-histoquímica e bioensaio em camundongos para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. Arq. Inst. Biol. São Paulo Jan/jun 68 (1): 13-17.
- 106- Sabin AB, Feldman HA 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). Science 108: 660-663.
- 107- Sáfadi MAP 2000. Toxoplasmose. Pediatria Moderna 36 (1/2): 9-19.
- 108- Saiki RK et al. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-1354.
- 109- Sinibaldi J, De Ramirez J 1992. Incidence of congenital toxoplasmosis in live Guatemalan newborns. Eur J Epidemiol. Netherlands 8 (4): 516-520.
- 110- Sounis E 1979. Bioestatística, 2.ed. Ver. McGraw-Hill do Brasil, Ltda.
- 111- Spalding SM, Amendoeira MRR, Ribeiro LC, Silveira C, Garcia AP, Camillo-Coura L 2003. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 36 (4): 483-491.
- 112- Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG et al. 1990. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. J. Infect Dis 162: 270-273.

- 113- Sternberger L, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG 1970. The unlabeled antibody method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (Horseadish peroxidase anti horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J. Histochem. Cytochem. 18: 315.
- 114- Thulliez P, Remington JS, Santoro F. et al. 1986. Une nouvelle reaction d'agglutination pour le diagnostic du stade évolutif de la toxoplasmose acquise. Path Biol 34: 174 -177.
- 115- Tsunematsu Y, Shioiri K, Kusano N 1964. Three cases of lymphadenopathy toxoplasmic with special reference to the application of fluorescent antibody technique for detection of *Toxoplasma gondii* in tissue. J. Exp. Med. 34 (4): 217-230.
- 116- Van Knapen F, Panggabeh SO, Van Leusden J 1985. Demonstration of Toxoplasma antigen containing complexes in active toxoplasmosis. J Clin. Microbiol. 22: 645-650.
- 117- Varella IS, Wagner MB, Darella AC 2003. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. J Pediatr (Rio de Janeiro). Porto Alegre 79: PAG
- 118- Vaz AJ, Guerra EM, Ferrato LCC, Toledo LAS, Azevedo NRS et al. 1990. Sorologia positiva para sífilis, toxoplasmose e Doença de Chagas em gestantes de primeira consulta em Centros de Saúde de área metropolitana, Brasil. Revista de Saúde Pública 24 (5): 373-379.
- 119- Veronesi R 1982. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. p.780-797.
- 120- Viotti NMA, Freire RL, Navarro IT, Vidotto O 1995. Avaliação das técnicas de Hematoxilina-Eosina, imunofluorescência e peroxidase anti-peroxidase no diagnóstico post-mortem da Toxoplasmose suína. Semina Cienc. Agric. 16 (1): 107-114.

- 121- Wallon M et al. 1999. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidencia of efficacy of treatment in pregnancy .BMJ 158: 318-1511.
- 122- Weiss LM et al 1991. Sensitive and specific detection of *Toxoplasma* DNA in an experimental murine model: use of *Toxoplasma gondii*-specific cDNA and the polymerase chain reaction. J Infect Dis. 163: 180-186.
- 123- Wilson CB, Remington JS, Stagno S 1980. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital toxoplasma infection. Pediatrics 66 (5): 767-774.
- 124- Wolf A, Cowen D 1939. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis): a new protozoan disease of man. Bull Neurol Inst NY 6: 307.
- 125- Wong SY, Remington JS 1993. Biology of *T. gondii*. AIDS 7 (3): 299-316.
- 126- Wong SY, Remington JS 1994. Toxoplasmosis in pregnancy. Clinical Infectious Diseases 18: 853-862.

7- ANEXOS

7.1 ANEXO I

Fluxograma do delineamento experimental realizado neste trabalho

7.2 ANEXO II

As instruções aos autores para publicação na Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz estão on line na página <http://www.memorias.ioc.fiocruz.br/>.

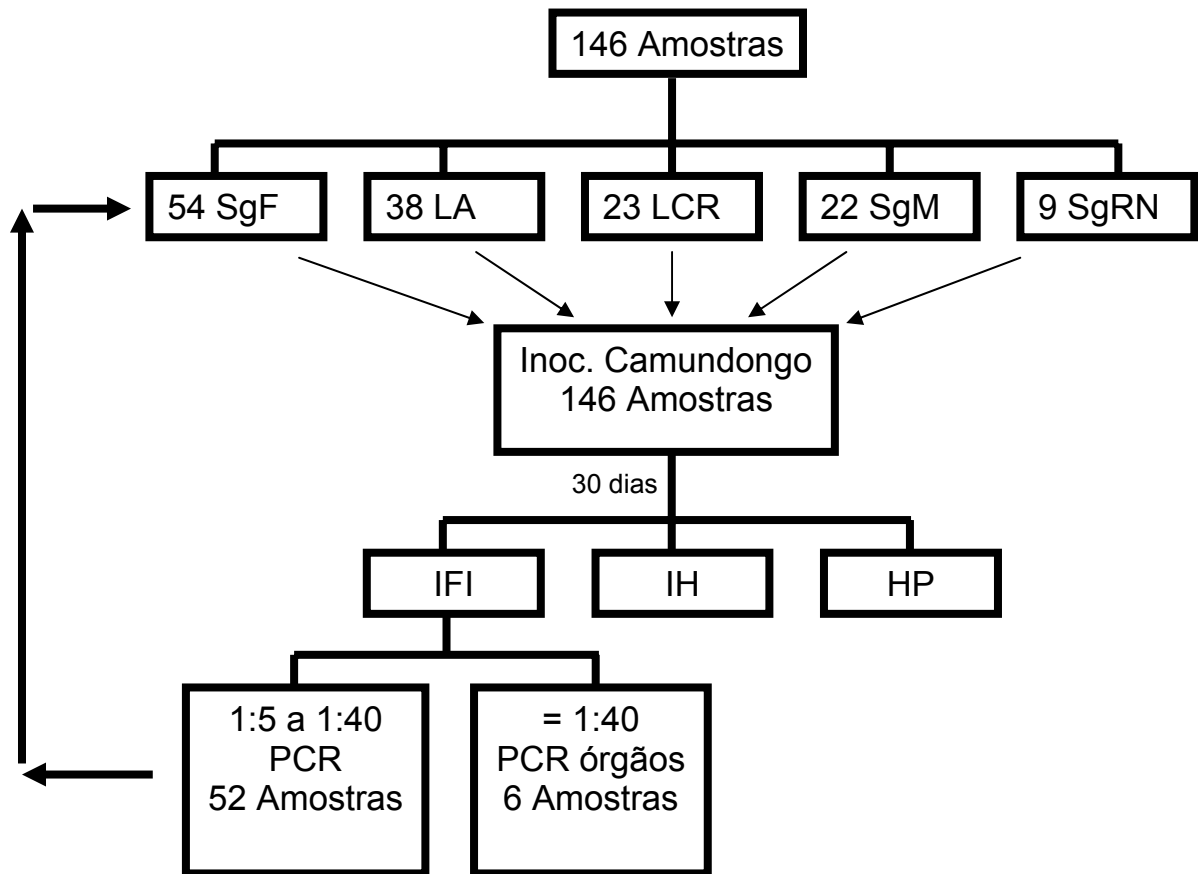
As regras para publicação de artigos na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical estão on line na página <http://www.sbmt.org/revista.htm>.

7.3 ANEXO III

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal sendo protocolado no CEOMHA/HC/UFG sob o nº 039/02, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

ANEXO I

Delineamento experimental



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](#)