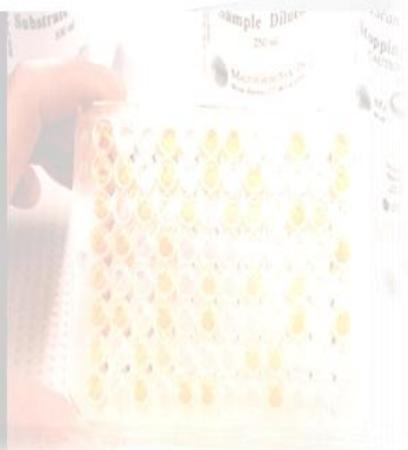
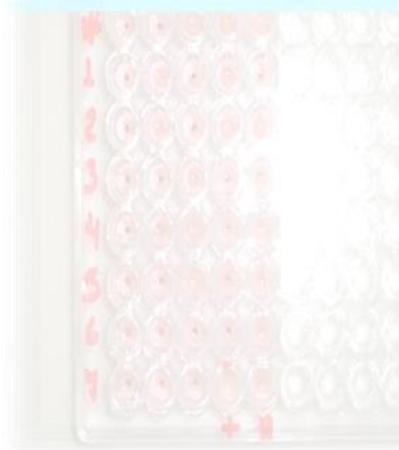


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
NÚCLEO DE DOENÇAS INFECCIOSAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

Priscila Pinto e Silva dos Santos

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA PESQUISA DE ANTICORPOS
ANTI-*TOXOPLASMA* POR CITOMETRIA DE FLUXO NO
DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE AGUDA HUMANA**



**Vitória
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Priscila Pinto e Silva dos Santos

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA PESQUISA DE ANTICORPOS
ANTI-*TOXOPLASMA* POR CITOMETRIA DE FLUXO NO
DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE AGUDA HUMANA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Moreira Lemos

**Vitória
2010**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

S237a Santos, Priscila Pinto e Silva dos, 1983-
Avaliação do desempenho da pesquisa de anticorpos anti-
Toxoplasma por citometria de fluxo no diagnóstico da
toxoplasmose aguda humana / Priscila Pinto e Silva dos Santos. –
2010.
122f. : ilus.

Orientadora: Elenice Moreira Lemos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Toxoplasmose. 2. Citometria de fluxo. 3. Sorodiagnóstico. I.
Lemos, Elenice Moreira. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU:61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda PRISCILA PINTO E SILVA DOS SANTOS, apresentou dissertação intitulada: “AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-TOXOPLASMA POR CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE AGUDA HUMANA” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, **APROVAR SEM RESTRIÇÕES**, a dissertação e habilitar a farmacêutica PRISCILA PINTO E SILVA DOS SANTOS, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 05 de março de 2010

Deise A. Oliveira Silva

Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva

Fausto Edmundo Lima Pereira

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Elenice Moreira Lemos

Profa. Dra. Elenice Moreira Lemos
(Orientadora)

A minha mãe, pelo amor incondicional, e a meu esposo que me incentivou a percorrer este caminho e sempre me estendeu a mão amiga nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais essa vitória, e pela força para chegar até aqui. “Não temas diante deles; porque estou contigo para te livrar, diz o SENHOR” (Jeremias 1:8).

À Professora Doutora Elenice Moreira Lemos, orientadora desta dissertação, por ter acreditado e depositado confiança em mim aceitando me orientar neste trabalho. Admiro seu entusiasmo, alegria, dedicação e disciplina. Agradeço por todas as críticas e sugestões. Serei eternamente grata por essa oportunidade.

Ao coordenador do Núcleo de Doenças Infecciosas Dr Reynaldo Dietze, pelo apoio na realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas na pessoa da Prof.^a Angélica Espinosa Barbosa Miranda, coordenadora da pós-graduação. A ela, meu respeito e admiração pela dedicação e empenho.

Ao Dr Fausto Edmundo Pereira Lima, professor do Programa de Pós-Graduação, por quem tenho grande admiração por sua dedicação em nome da ciência.

Aos professores da pós-graduação por todo incentivo e disposição.

A Dra Geisa Baptista de Barros, colaboradora deste trabalho, que gentilmente compartilhou comigo seus pacientes, pela simplicidade, alegria e convívio tão agradáveis.

Aos nossos colaboradores do Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia pela ajuda no preparo dos antígenos e, em especial, ao Dr. José Roberto Mineo por sua sabedoria que tanto contribuiu no início deste trabalho, e à Dra Deise Aparecida de Oliveira Silva, sempre tão solícita em nos ajudar e, ainda, pela disponibilidade em avaliar esta dissertação.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/Fiocruz Minas) por todas as sugestões para a análise dos dados desta dissertação.

Agradeço ao Mauro Hygino Weinert Menegaz, aluno de Iniciação Científica do Laboratório de Leishmanioses, por toda ajuda na realização deste trabalho, principalmente pelas intermináveis leituras no citômetro.

Aos meus colegas do Laboratório de Leishmanioses (Camila, Gilson, Jauber, Juliana, Laura, Marco André, Nayana, Renata) e àqueles que também já fizeram parte deste (Aretha, Bruna, Lucas, Marcela, Mauro, Vitor). Obrigada pelos momentos de descontração e amizade.

Aos meus amigos do mestrado (Adriana, Eliana, Maria Carolina, Mayra, Marco André, Thaís e Thiago) pela amizade, pelas inúmeras conversas de incentivo, pela convivência tão agradável e cumplicidade durante as disciplinas cursadas.

A todos os funcionários do NDI pela atenção e disponibilidade sempre que necessário.

À Fátima Aparecida Pereira, secretária da pós-graduação, por todo apoio e pelo auxílio nas questões burocráticas.

Aos meus pais, por todo amor, incentivo e apoio.

Em especial a minha mãe, que sempre lutou por mim, abdicando de muitos de seus sonhos em favor dos meus, e por ser tão presente em minha vida.

Ao meu querido esposo, pela compreensão e paciência, principalmente nos momentos de ansiedade e preocupação. Obrigada por fazer parte da minha vida.

A todos os familiares e amigos que sempre torceram pelo meu sucesso.

*“Sempre que te perguntarem se
podes fazer um trabalho, responde
que sim e te ponhas em seguida a
aprender como se faz.”*

(F. Roosevelt)

RESUMO

O diagnóstico da toxoplasmose baseia-se principalmente, na detecção de anticorpos específicos em soro de pacientes, por meio de ensaios sorológicos. As maiores limitações referem-se à alta prevalência de anticorpos de IgG e IgM persistentes por longos períodos, dificultando o diagnóstico da infecção aguda. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho da imunofluorescência indireta por citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos anti-taquizoítas fixados (AATF) de *T. gondii* e avidéz de IgG no sorodiagnóstico da toxoplasmose aguda humana. Foram analisadas amostras de pacientes com toxoplasmose aguda (AG), crônica (CR), indivíduos não-infectados (NI) e pacientes portadores de outras doenças. A pesquisa de AATF IgM permitiu segregar os grupos AG e CR utilizando a diluição de soro 1:32.000 e ponto de corte (PC) de 40% de porcentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), com sensibilidade de 100% e especificidade de 90%. Na avaliação da reatividade cruzada de IgM foram encontrados resultados falso-positivos, apenas para pacientes portadores de malária e mononucleose infecciosa. Entretanto, a pesquisa de AATF IgG, utilizando PC de 10% PPFP e diluição do soro de 1:32.000 permitiu segregar apenas os grupos AG e NI, com 93,3% de sensibilidade e 100% de especificidade. Quanto à pesquisa de AATF subclasses de IgG, as diluições séricas escolhidas aplicadas no diagnóstico da toxoplasmose aguda, utilizando como controle o grupo NI foram 1:32.000 para IgG1, 1:400 para IgG2, 1:2.000/1:8.000 para IgG3 e 1:400/1:1.600 para IgG4 e PC de 10% PPFP, para todas as subclasses. Entretanto, apenas AATF IgG2 e AATF IgG4 apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade. A pesquisa da avidéz de IgG quando aplicada na segregação dos grupos AG e CR, apresentou 100% de sensibilidade e especificidade. Utilizando-se a pesquisa de AATF IgM como ensaio inicial, e avidéz de IgG como ensaio confirmatório, foi possível estabelecer o diagnóstico da toxoplasmose aguda. Os índices de desempenho demonstraram melhor desempenho da pesquisa de anticorpos IgM anti-*T. gondii* e avidéz de IgG por citometria de fluxo do que pelo sistema VIDAS® TOXO (ELFA – *Enzyme Linked Fluorescent Assay*) no diagnóstico da toxoplasmose aguda. Esses resultados demonstram a aplicabilidade da citometria de fluxo para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, como uma importante ferramenta no diagnóstico da toxoplasmose aguda.

Palavras-chave: Toxoplasmose aguda humana, diagnóstico sorológico, citometria de fluxo.

ABSTRACT

The diagnosis of toxoplasmosis is based mainly on the detection of specific antibodies in sera of patients by serological tests. The major limitations of these tests are the high prevalence of IgG and IgM antibodies, which persist for long periods of time, hampering the diagnosis of acute infection. Therefore, the objective of this study was to evaluate the performance of an indirect immunofluorescence assay based on flow cytometry for the detection of the reactivity of anti-fixed tachyzoites antibodies (AFTA) of *T. gondii* and IgG avidity in the serodiagnosis of human acute toxoplasmosis. Serum samples from patients with acute toxoplasmosis (AC), chronic toxoplasmosis (CHR), non-infected individuals (NI), and patients with other diseases were analyzed. The analysis of AFTA IgM allowed to segregate groups AC and CHR using a serum dilution of 1:32,000 and a percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) of 40% as cut off, resulting in 100% and 90% of sensitivity and specificity, respectively. However, the analysis of AFTA IgG using a PPFP of 10% as cut off and a serum dilution of 1:32,000 allowed to segregate only the group AC and NI, with 93,3% of sensitivity and 100% of specificity. The serum dilutions applied on the study of AFTA IgG subclasses in the diagnosis of acute toxoplasmosis using NI as control group were: 1:32,000 for IgG1, 1:400 for IgG2, 1:2,000 and 1:8,000 for IgG3, and 1:400 and 1:1,600 for IgG4. It was used a PPFP of 10% as a cut off for all subclasses. Moreover, only AFTA IgG2 and AFTA IgG4 showed 100% of sensitivity and specificity. The analysis of IgG avidity when to groups AC and CHR, showed 100% of sensitivity and specificity. Using the AFTA IgM as the initial test and IgG avidity as a confirmatory test, it was possible to establish the diagnosis of human acute toxoplasmosis. The evaluation of IgM cross-reactivity demonstrated false-positive results only for patients with malaria and infectious mononucleosis. The detection of IgM anti-*T. gondii* antibodies and IgG avidity by flow cytometry showed a better performance in comparison to the VIDAS[®] TOXO (ELFA - *Enzyme Linked Fluorescent Assay*) in the diagnosis of acute toxoplasmosis. These results demonstrate the applicability of the detection of anti-*T. gondii* antibodies by flow cytometry and its importance in the diagnosis of human acute toxoplasmosis.

Keywords: Human acute toxoplasmosis, Serological diagnosis, Flow cytometry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.....	48
Tabela 2: Índices de desempenho obtidos através da curva ROC para as diluições avaliadas dos soros.....	59
Tabela 3: Razões de verossimilhança (RVs) da pesquisa de AATF IgM na diluição 1:32.000 e ponto de corte 40%.....	65
Tabela 4: Categorias de resultados da pesquisa de AATF IgM (VPos, FPos, FNeg e VNeg) para pacientes AG e indivíduos portadores de outras doenças.....	66
Tabela 5: Índices de desempenho da pesquisa de AATF IgM, na diluição 1:32.000 e ponto de corte 40%, de pacientes AG e pacientes com outras condições clínicas.....	68
Tabela 6: Índices de desempenho da pesquisa de AATF subclasses de IgG..	79
Tabela 7: Índices de desempenho do ELFA e da pesquisa de AATF IgM, expressos em porcentagem, no diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	30
Figura 2: Principais formas de transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i>	32
Figura 3: Sequência de análise de anticorpos anti-taquizoítas de <i>T. gondii</i> por citometria de fluxo. Seleção da população de formas taquizoítas, em gráficos de tamanho e granulosidade (A). Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes (PPFP) obtidos como controle da reação, sem soro (B), após a incubação com um soro negativo (C) e com soro positivo (D). O posicionamento do marcador (M1) segue o critério de se obter no máximo 2%, de PPFP para o controle da reação.....	52
Figura 4: Curva ROC dos testes 1 e 2, construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100 - especificidade) dos testes avaliados. Os resultados estão expressos pelos pontos dos gráficos que representam os valores dos respectivos índices e delimitam a área sob a curva (ASC) para o teste 1 (ASC= 0,988) e para o teste 2 (0,784).....	55
Figura 5: Curva de reatividade de IgM anti- formas taquizoítas fixadas de <i>T. gondii</i> presentes em soros (A) de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) de indivíduos não-infectados NI (○). Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PPFP.....	58
Figura 6: Avaliação da amplitude (delta - Δ) de segregação entre as reatividades médias de IgM dos soros de pacientes com Toxoplasmose aguda AG (●) e de indivíduos não-infectados NI (○), com os respectivos valores de Δ . A área delimitada equivale às diluições cujos Δ foram superiores a 70%.....	59

Figura 7: Curvas ROC da pesquisa de AATF IgM construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100-especificidade) nas diluições do soro 1:2.000, 1:8000 e 1:32.000. Os resultados representam os valores dos índices avaliados e delimitam a área sob a curva (ASC). Os círculos coloridos dentro das curvas ROC, representam o melhor ponto de corte para pesquisa de AATF IgM. S=Sensibilidade; E=Especificidade e PC=Ponto de corte..... 60

Figura 8: Análise da reatividade individual de IgM nas diluições do soro, selecionadas para os grupos AG (●) e NI (○). O resultado está expresso em valores de PFPF..... 61

Figura 9: Curva de reatividade de IgM anti- formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* presentes em soros (A) de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) toxoplasmose crônica CR (●). Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFPF..... 62

Figura 10: Avaliação da amplitude (delta - Δ) de segregação entre as reatividades médias de IgM dos soros de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e toxoplasmose crônica CR (●) com os respectivos valores de Δ . A área delimitada equivale à diluição cujo Δ foi superior a 70%..... 63

Figura 11: Curva ROC da pesquisa de AATF IgM construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100-especificidade), na diluição do soro 1:32.000. Os resultados representam os valores dos referidos índices avaliados e delimitam a área sob a curva (ASC). S=Sensibilidade; E=Especificidade e PC=Ponto de corte..... 63

Figura 12: Análise da reatividade individual de IgM na diluição soro selecionada dos grupos NI (○), AG (●) e CR (●). A linha pontilhada refere-se ao ponto de corte selecionado através da curva ROC. O resultado da reatividade de IgM para cada amostra individual está expresso em valores de PFPF..... 64

Figura 13: Análise do desempenho da TG-ROC na diluição do soro 1:32.000 em população constituída pelos grupos AG e CR para definição do ponto de corte. As linhas rosa e verde representam, respectivamente, os índices de Sensibilidade e Especificidade da metodologia.....	65
Figura 14: Análise da reatividade de IgM anti- <i>T. gondii</i> em amostras individuais de pacientes portadores de toxoplasmose AG, CH, TB, MAL, CMV, EBV, RUB, HSV, LV, FAN e indivíduos NI, na diluição do soro 1:32.000. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFP empregando-se, como ponto de corte, um valor de 40% (linha pontilhada).....	67
Figura 15: Curva de reatividade de IgG anti- formas taquizoítas fixadas de <i>T. gondii</i> presentes em soros (A) de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) de indivíduos não-infectados NI (○) Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFP.....	70
Figura 16: Avaliação da amplitude (delta- Δ) de segregação entre as reatividades médias de IgG dos soros de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e indivíduos não-infectados NI (○), com os respectivos valores de Δ . A área delimitada equivale à diluição cujo Δ foi superior a 70%.....	71
Figura 17: Curva ROC da pesquisa de AATF IgG construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e 100-especificidade, na diluição 1:32.000. Os resultados representam os valores dos referidos índices avaliados e delimitam a área sob a curva (ASC). S=Sensibilidade; E=Especificidade e PC=Ponto de corte.....	72
Figura 18: Análise da reatividade individual de IgG na diluição do soro selecionada dos grupos AG (●) e NI (○). A linha pontilhada refere-se ao ponto de corte selecionado através da curva ROC. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP.....	72

- Figura 19:** Curva de reatividade de IgG anti- formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* presentes em soros (A) de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) toxoplasmose crônica CR (●). Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFPF..... 73
- Figura 20:** Avaliação da amplitude de segregação entre as reatividades médias de IgG dos soros de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e toxoplasmose crônica CR (●)..... 74
- Figura 21:** Curva de reatividade de subclasses de IgG anti- formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* presentes em soros (A) de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) de indivíduos não-infectados NI (●) Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFPF..... 76
- Figura 22:** Avaliação da amplitude (delta - Δ) de segregação entre as reatividades médias de subclasses de IgG dos soros de pacientes com Toxoplasmose aguda AG (●) e de indivíduos não infectados NI (●), com os respectivos valores de Δ . A área delimitada equivale às diluição cujos Δ foram superiores a 70%..... 77
- Figura 23:** Curvas ROC da pesquisa de AATF subclasses de IgG construída a partir dos índices de desempenho. Os resultados representam os valores dos referidos índices avaliados e delimitam a área sob a curva (ASC). O círculo dentro da curva representa o melhor ponto de corte sugerido pela curva para a pesquisa de AATF subclasses de IgG. S=Sensibilidade; E=Especificidade e PC=Ponto de corte..... 78
- Figura 24:** Análise da reatividade de subclasses de IgG nas diluições selecionadas para os grupos AG (●) e NI (●) através do perfil de dispersão individual das amostras. O resultado da reatividade de subclasses de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFPF..... 80

Figura 25: Curva de reatividade de subclasses de IgG anti- formas taquizoítas fixadas de <i>T. gondii</i> presentes em (A) soros de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) toxoplasmose crônica CR (●). Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFPF.....	81
Figura 26: Avaliação da amplitude de segregação entre as reatividades médias de subclasses dos soros de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e toxoplasmose crônica CR (●).....	82
Figura 27: Curva de titulação de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> do ensaio de avidéz de IgG de 3 amostras de pacientes do grupos AG e 3 pacientes CR, da placa lavada com PBS-3%SFB (U ⁻ :linha contínua) e lavada com uréia 6M (U ⁺ :linha pontilhada), a zona cinza refere-se aos valores de PFPF<30%. Os índices de avidéz foram calculados seguindo a fórmula: $IA=[PFPF(U^+)/PFPF(U^-)] \times 100$	84
Figura 28: Curva ROC da pesquisa da avidéz de IgG construída a partir dos índices de desempenho. Os resultados representam os valores dos referidos índices avaliados e delimitam a área sob a curva (ASC). O círculo dentro da curva representa o melhor ponto de corte sugerido pela curva para a pesquisa de AATF subclasses de IgG. S=Sensibilidade; E=Especificidade e PC=Ponto de corte.....	85
Figura 29: Análise dos índices de avidéz dos grupos AG (●) e CR (●) através do perfil de dispersão individual das amostras. Pacientes do grupo CR (●) que possuíam IgM residual e foram encontrados índice de avidéz alto (>60%) para pesquisa da avidéz de IgG.....	85

Figura 30: Combinação dos resultados da pesquisa de AATF IgM e índice de avidéz de IgG por citometria de fluxo em pacientes do AG (●) e CR (●). Resultados de IgM residual para pesquisa de AATF IgM (●) encontrados no grupo CR.....	86
Figura 31: Análise da reatividade de IgM anti- <i>T. gondii</i> por ELFA, em soros individuais de pacientes dos grupos AG (●) e CR (●). O resultado da reatividade de IgM para cada amostra individual está expresso em Unidades internacionais/ml (UI/ml), empregando o valor >0,65 (linha pontilhada) como ponto de corte, conforme descrito pelo fabricante. Os resultados mostram a sensibilidade de (100%), e especificidade de (14,3%) do ELFA aplicada em soros de pacientes dos grupos AG e CR.....	87
Figura 32: Análise dos Índices de Avidéz de IgG por ELFA, em soros individuais de pacientes dos grupos AG (●) e CR (●), empregando $IA \geq 0,30$ (linha pontilhada) como ponto de corte. Os resultados mostram a sensibilidade de 100%, e especificidade de 70% do ELFA aplicada em soros de pacientes dos grupos AG e CR.....	88
Figura 33: Comparação dos resultados da pesquisa de IgM e índice de avidéz de IgG pelo ELFA em soros de pacientes do AG (●) e CR (●). Pacientes com resultados IgM residual (●) foram encontrados no grupo CR.....	89
Figura 34: Resultados encontrados nos ensaios de citometria de fluxo para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana	91
Figura 35: Proposta de algoritmo para diagnóstico da toxoplasmose aguda humana utilizando CF/IFI	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AATF:** Anticorpo anti-taquizoítas fixados
- AC/HS:** Teste de Aglutinação Diferencial (acetona/formalina)
- AcM:** Anticorpo Monoclonal
- AcP:** Anticorpo Policlonal
- AG:** Grupo de amostras de pacientes com toxoplasmose aguda
- ASC:** Área sob a curva (acurácia)
- BAG:** Antígenos associados à forma bradizoíta
- CF:** Citometria de fluxo
- CH:** Grupo de amostras de indivíduos com Doença de Chagas
- CMV:** Grupo de amostras de indivíduos com Citomegalovírus
- CR:** Grupo de amostras de pacientes com toxoplasmose crônica
- DAT:** Teste de Aglutinação Direta
- E:** Especificidade
- EBV:** Grupo de amostras de indivíduos com Epstein Barr Vírus
- ELFA:** *Enzyme Linked Fluorescent Assay*
- ELISA:** *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- FAN:** Grupo de amostras de indivíduos com Fator anti-nuclear
- Fc:** Fração cristalizável de imunoglobulina.
- FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína, do inglês '*Fluorescein Isothiocyanate*'
- FL1:** Fluorescência do tipo 1 (verde)
- FL2:** Fluorescência do tipo 2 (laranja)
- FNeg:** Falso-negativo
- FPos:** Falso-positivo
- FSC:** Dispersão frontal (Tamanho), do inglês *Forward Scatter*
- GRA:** Antígeno de grânulo denso de *Toxoplasma gondii*

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HSV: Grupo de amostra de indivíduos com Herpes simples vírus

IA: Índice de avidéz

IC: Intervalo de Confiança

IFI: Imunofluorescência Indireta

IgG: Imunoglobulina G

IgG1: Subclasse de Imunoglobulina IgG1

IgG2: Subclasse de Imunoglobulina IgG2

IgG3: Subclasse de Imunoglobulina IgG3

IgG4: Subclasse de Imunoglobulina IgG4

IgM: Imunoglobulina M

ISAGA: *'Immunosorbent Agglutination Assay'*

LV: Grupo de amostras de indivíduos com Leishmaniose Visceral

MAG: Antígeno secretado pela matriz do cisto

MAL: Grupo de amostra de indivíduos com Malária

MAT: Aglutinação Direta Modificada

MIC: Antígeno de micronema de *Toxoplasma gondii*

NI: Grupo de amostras de indivíduos não infectados

PBS: Solução salina tamponada com fosfato, do inglês *'Phosphate Buffered Saline'*

PC: Ponto de Corte

PCR: *'Polimerase Chain Reaction'*

ph: Potencial hidrogeniônico

PPFP: Porcentagem de Parasitos Fluorescentes Positivos

ROC – *'Receiver Operating Characteristic Curve'*

ROP: Antígeno de roptria de *Toxoplasma gondii*

RUB: Grupo de amostras de indivíduos com Rubéola

RV: Razão de verossimilhança

S: Sensibilidade

SAG: Antígeno de superfície de *Toxoplasma gondii* ligado a âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol

SAPE: Estreptoavidina-ficoeritrina

SFB: Soro fetal bovino

SSC- Dispersão lateral (Granulosidade), do ingles '*Side Scatter*'

TB: Grupo de amostras de indivíduos com Tuberculose

TG-ROC: '*Two-Graph Roc Curve Analysis*'

U⁻: Amostras não tratadas com uréia

U⁺: Amostras tratadas com uréia

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UI/ml: Unidades internacionais/mililitro

VNeg: Verdadeiro-negativo

VPos: Verdadeiro-positivo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	24
1. Histórico	25
2. Epidemiologia	26
3. O <i>Toxoplasma gondii</i>	27
4. Ciclo Biológico	29
5. Transmissão	30
6. Diagnóstico Laboratorial da Toxoplasmose	32
OBJETIVOS	43
1. Objetivo Geral	44
2. Objetivos Específicos	44
PACIENTES E MÉTODOS	45
1. Aspectos Éticos	46
2. Amostras de soros	46
3. Pesquisa de anticorpos anti-formas taquizoítas fixadas de <i>T. gondii</i> por citometria de fluxo	47
3.1 Manutenção e obtenção das formas taquizoítas de <i>T. gondii</i>	47
3.2 Preparo das formas taquizoítas fixadas de <i>T. gondii</i>	47
3.3 Anticorpos reveladores utilizados para os ensaios de citometria de fluxo	48
3.4 Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo para pesquisa de anticorpos IgM, IgG e subclasse de IgG	49
3.5 Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo para pesquisa da avidéz de anticorpos IgG	50
3.6 Aquisição e análise dos dados da citometria de fluxo	51
4 Pesquisa de anticorpos IgG, IgM e avidéz de IgG anti- <i>T. gondii</i> por ELFA (<i>Enzyme Linked Fluorescente Assay</i>)	52
4.1 Pesquisa de IgM	52
4.2 Pesquisa de IgG	53
4.3 Pesquisa da Avidéz de IgG	53

5 Análise do desempenho da metodologia para o diagnóstico da Toxoplasmose	53
5.1 Análise da Curva ROC - <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>	53
RESULTADOS	56
1. Estabelecimento dos critérios de interpretação da pesquisa de AATF IgM aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica	57
1.1 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana	57
1.2 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica	61
1.3 Avaliação da aplicabilidade da pesquisa de AATF IgM na segregação sorológica de pacientes com toxoplasmose aguda e pacientes portadores de outras condições clínicas	66
2 Estabelecimento dos critérios de interpretação da pesquisa de AATF IgG aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica	69
2.1 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana	69
2.2 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica	73
3. Estabelecimento dos critérios de interpretação da pesquisa de AATF subclasses de IgG aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica	75
3.1 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana	75
3.2 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica	80
4. Estabelecimento dos critérios de interpretação da pesquisa de avidéz de anticorpos IgG aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica	83

5. Análise comparativa do desempenho da pesquisa de anticorpos anti-<i>T. gondii</i> por citometria de fluxo e pelo sistema VIDAS® TOXO (ELFA – <i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>) no diagnóstico da toxoplasmose aguda e na exclusão da toxoplasmose crônica	87
6. Estabelecimento de algoritmo para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana utilizando citometria de fluxo	90
DISCUSSÃO	94
CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXO	121
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	122

Introdução

1. Histórico

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii*, com ampla distribuição mundial e alta prevalência sorológica (Remington et al., 2006).

Um aspecto interessante do parasito foi sua descoberta simultânea, em 1908, no Brasil e na Tunísia. Alfonso Splendore, pesquisador de origem italiana e radicado no Brasil, em julho de 1908, ao trabalhar com coelhos no Instituto Biológico de São Paulo, observou uma doença cujo quadro anatomopatológico era semelhante à leishmaniose visceral humana e 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. No mesmo ano, Nicolle e Manceaux, do Instituto Pasteur de Tunis, descreveram um microrganismo semelhante àquele observado por Splendore, em células mononucleares do baço e do fígado de um roedor norte-africano, *Ctenodactylus gondii*. Entretanto, o gênero *Toxoplasma* foi introduzido posteriormente, após o parasita ter sido diferenciado de parasitos do gênero *Leishmania* e, apenas, uma espécie, *Toxoplasma gondii*, tem sido identificada em isolados de animais e humanos (Nicolle & Manceaux, 2009).

Somente anos mais tarde a doença foi descrita em humanos, quando um oftalmologista encontrou cistos do parasito na retina de uma criança (Janku, 1923 apud Remington et al., 2006).

A partir de 1937, Wolf e Cowan relataram vários casos da doença em crianças em que, provavelmente, havia ocorrido uma transmissão congênita. A importância do *T. gondii* como patógeno humano só foi elucidada quando, no mesmo ano, Sabin e Olitsky (1937) confirmaram a associação do parasito com encefalite granulomatosa infantil.

Entretanto, a frequência da infecção humana só foi conhecida a partir de 1948 com a introdução do clássico teste do corante de Sabin & Feldman (Sabin & Feldman, 1948).

2. Epidemiologia

A toxoplasmose, em sua forma latente (crônica), tem ampla distribuição mundial, como tem sido demonstrado por vários inquéritos sorológicos entre populações humanas e de outros animais. Estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada pelo *T. gondii* (Sensini, 2006).

A prevalência da infecção na espécie humana depende de vários fatores como, idade, hábitos alimentares, clima e contato com o solo (Cook et al., 2000). Estudos em populações humanas têm mostrado que a soroprevalência da toxoplasmose pode apresentar variação entre diferentes países, diferentes áreas geográficas dentro de um país e, mesmo, entre diferentes grupos étnicos vivendo em uma mesma área (Remington et al., 2006).

No Brasil, como a prevalência de anticorpos na população adulta é bastante variável de 40% a 80%, a toxoplasmose pode ser um grave problema de saúde pública em algumas regiões. Coêlho et al. (2003) demonstraram 79% de soropositividade através da detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma* em doadores de sangue na cidade de Recife (PE). Em inquérito epidemiológico realizado na cidade de Fortaleza (CE) Rey & Ramalho (1999) encontraram 22,8% de soropositividade entre pré-escolares, e 58,4% e 71,5% em estudantes e puérperas, respectivamente. Entre crianças, moradoras de Jardim São Remo, São Paulo (SP), Francisco et al. (2006) encontraram 32,4% de soroprevalência para *T. gondii*, enquanto Lopes et al. (2008) identificaram 46,4% de ocorrência de IgG anti-*Toxoplasma* entre alunos do ensino fundamental em Jataizinho (PR). Barros et al. (1979) avaliaram 40 estudantes de medicina da Universidade Federal do Espírito Santo e encontraram uma prevalência de 47,5%. Em estudo recente realizado em Vitória (ES), Areal (2007) encontrou 73,5% de soropositividade para o *T. gondii*, dentre 1.153 gestantes atendidas em unidades de saúde do município.

Surtos epidêmicos de toxoplasmose também têm sido relatados em várias regiões do mundo, relacionados à presença de gatos ou ingestão de carne mal cozida (Coutinho et al., 1981). No Brasil, áreas de alta endemicidade têm sido descritas. Uma delas fica na região de Erechim (RS), onde o manuseio da carne crua para

confeção de linguiça e similares tem sido responsabilizado pela elevada prevalência da doença (Glasner et al., 1992). Outra área encontra-se ao norte do Estado do Rio de Janeiro, onde a água oferecida à população, provavelmente poluída por fezes de gato, foi apontada como fonte de infecção (Bahia-Oliveira et al., 2003).

Frenkel et al. (1975) descreveram a importância epidemiológica dos gatos, principalmente os mais jovens porque, quando infectados pela primeira vez, eliminam milhões de oocistos que persistem viáveis no solo por cerca de um ano ou mais, na dependência das condições de umidade e temperatura. Assim, menores prevalências têm sido encontradas em regiões muito frias ou muito áridas, onde a baixa densidade de felinos, aliada à menor sobrevivência dos oocistos no solo, diminui os índices de parasitismo de herbívoros, roedores e pássaros e, conseqüentemente, dos carnívoros que deles se alimentam.

3. *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* é um protozoário intracelular do filo Apicomplexa, pertencente à classe *Conoidasida*, subclasse *Coccidiasina*, ordem *Eucoccidiorida*, da subordem *Eimereina*, família *Sarcocystidae*, subfamília *Toxoplasmatidae* e gênero *Toxoplasma*. É a única espécie desse gênero. Com relação ao nome *Toxoplasma gondii*, o termo *Toxoplasma* deve-se à forma, em lua crescente, dos taquizoítos e bradizoítos (em grego, toxon = arco, plasma = forma), enquanto o termo *gondii* refere-se à espécie (*Ctenodactylus gondii*) em que o parasita foi inicialmente encontrada. (Wong & Remington, 1993).

O parasito apresenta-se na natureza sob três formas infecciosas: **Oocisto**, contendo esporocisto e esporozoítos; **Taquizoíta** ou a forma de multiplicação rápida; **Bradizoíta**, denominado forma de multiplicação lenta nos cistos teciduais (Dubey et al., 1998).

Os oocistos, que possuem forma arredondada, são produto da fase sexuada de *T. gondii* que ocorre em células do epitélio intestinal de membros da família *Felidae*,

são eliminados na forma não esporulada (não infectante) no ambiente, juntamente com as fezes desses animais. O período de esporulação pode variar de 3 a 21 dias, dependendo do grau de aeração, temperatura e umidade do ambiente. Após a esporulação, os oocistos, com cerca de 11 a 14 μm de diâmetro, abrigando 8 esporozoítos em seu interior, tornam-se infectantes (Dubey, Miller & Frenkel, 1970). Quando esporulados podem resistir à ação de enzimas digestivas e tolerar uma diversidade de variações ambientais, podendo manter sua infectividade por 18 meses no solo, em temperaturas entre -20°C a 35°C (Frenkel et al., 1975). Os oocistos maduros são infectantes quando ingeridos, tanto pelo próprio gato como por outros animais, inclusive o homem.

Os taquizoítas possuem forma alongada ou ovalada. O termo taquizoíto (taqui = rápido, em grego) foi atribuído por Frenkel (1973) para descrever a forma de proliferação rápida. Sua multiplicação dentro das células do hospedeiro dá-se por sucessivas endodiogenias, um processo de brotamento interno em que duas células-filhas são formadas dentro dos vacúolos intracitoplasmáticos das células-mãe sendo, então, liberadas após ruptura. Os taquizoítas, durante a fase aguda da infecção, invadem células do hospedeiro onde se multiplicam rapidamente nos seus vacúolos formando rosetas. E quando seu citoplasma torna-se repleto de taquizoítos ocorre seu rompimento com a liberação destes, que conseguem invadir as células contíguas, ou são fagocitados (Amato & Marchi, 2002). Essa forma parasitária é pouco resistente à ação de enzimas digestivas, congelamento e dessecação. Sendo assim, requer um hábitat intracelular para se multiplicar e sobreviver porque é rapidamente destruída no suco gástrico (Jacobs, Remington & Melton, 1960).

Já os bradizoítas, que possuem morfologia similar aos taquizoítas, são organismos de multiplicação lenta ou de repouso nos cistos teciduais que podem persistir por toda a vida do hospedeiro, o que caracteriza a fase crônica da infecção. O termo bradizoíto (bradi = lento, em grego) também foi atribuído por Frenkel (1973) para descrever a lenta multiplicação dessa forma parasitária no interior de vacúolos citoplasmáticos, o que leva à perda completa da estrutura da célula do hospedeiro, originando cistos de paredes nítidas. O tamanho dos cistos depende da quantidade de bradizoítos; cistos jovens podem conter somente 2 bradizoítos e apresentar menos de 5 μm de diâmetro, enquanto os mais velhos podem conter centenas de organismos e apresentar mais de 200 μm de diâmetro (Dubey et al., 1998).

4. Ciclo Biológico

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxeno facultativo porque ocorre em duas fases distintas (Figura 1), alternando entre fases de reprodução assexuada, em seus hospedeiros intermediários e fases de reprodução sexuada, em seus hospedeiros definitivos.

A reprodução sexuada, gametogônica descrita por Hutchison, Dunachie & Work (1968), Frenkel et al. (1970) e Jewell et al. (1972), além de outros, ocorre apenas em seus hospedeiros definitivos, membros da família *Felidae*, cujo representante mais importante na transmissão da doença para a espécie humana é o gato. Já os homens, mamíferos não-felinos e pássaros são considerados hospedeiros intermediários, nos quais ocorre apenas a reprodução assexuada.

O hospedeiro definitivo pode ser infectado por bradizoítos ou esporozoítos após a ingestão de cistos ou oocistos, respectivamente. Os parasitos infectam as células da mucosa gástrica e iniciam uma série de divisões múltiplas assexuadas, processo denominado esquizogonia, que resulta na formação dos esquizontes e liberação dos merozoítas. Já no interior das células do epitélio intestinal, se diferenciam em gametas femininos e masculinos que se fundem, formando oocistos. Após o rompimento das células enteroepiteliais, os oocistos alcançam a luz intestinal e são, posteriormente, eliminados no ambiente junto com as fezes dos animais. O oocisto não esporulado contém um esporonte que preenche o oocisto. Durante a esporulação, já no ambiente, o esporonte divide-se em dois corpos arredondados chamados esporoblastos que, em seguida tornam-se alongados formando os esporocistos, abrigando 4 esporozoítos cada (Dubey & Beattie, 1988).

Já os hospedeiros intermediários são infectados por cistos, oocistos ou taquizoítos mas, independentemente da forma de transmissão, *T. gondii* realiza seu ciclo de reprodução assexuada. Após infectar as células hospedeiras, os parasitos invadem as células epiteliais intestinais, bem como outros tipos celulares locais e, após alguns ciclos de reprodução rápida, por endodiogenia, são liberados diversos taquizoítas que invadem novas células nucleadas, disseminando-se por vários tecidos do organismo. A multiplicação do parasito, com conseqüente destruição

celular, ocorre até o desenvolvimento da imunidade humoral e celular, o que resulta na formação de cistos, onde os bradizoítos se multiplicam lentamente por endodiogenia (Frenkel, 1991; Dubey et al., 1998).

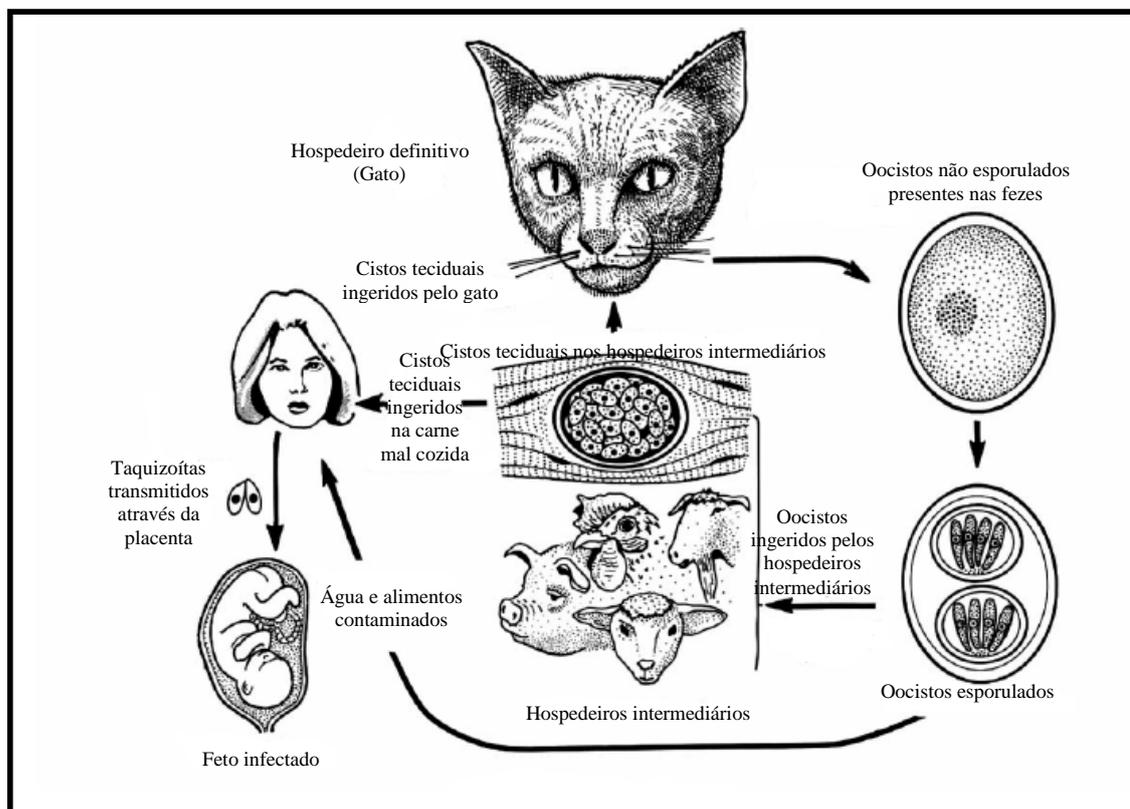


Figura 1: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.

FONTE: Dubey et al, 1998.

5. Transmissão

A via oral tem sido relatada por Cook et al. (2000) como a mais importante via de transmissão de *T. gondii*. Essa forma de transmissão está geralmente relacionada a hábitos culturais e alimentares, como ingestão de carnes cruas sem controle sanitário adequado, e tem sido responsável pela maior taxa de transmissão da doença. Assim, animais carnívoros e onívoros, inclusive o homem, quando se alimentam da carne crua ou mal passada, de animais que já tenham sido

anteriormente infectados pelo parasito e que estejam albergando cistos contendo bradizoítos em seus tecidos, tornam-se infectados.

Outra importante forma de transmissão oral, principalmente nos países subdesenvolvidos (Baril et al., 1999; Rai et. al., 1999), é através da ingestão de oocistos eliminados nas fezes de gatos infectados (Dubey et al., 1998) que contaminam água (Bahia-Oliveira et al., 2003), solo, jardins, caixas de areia, lixo e podem ser encontrados também em vegetais mal lavados ou mesmo serem disseminados através de hospedeiros transportadores, como baratas, moscas e minhocas (Ruiz & Frenkel, 1980). O contato com solo contaminado por oocistos de *T. gondii* sem a proteção de luvas, principalmente em práticas de jardinagem e limpeza de recipientes onde os gatos eliminam suas fezes, são também fatores de risco para a infecção (Kravetz & Federman, 2005).

Se oocistos e cistos estão associados à transmissão da toxoplasmose após o nascimento, os taquizoítas são responsáveis pelos casos de transmissão congênita e, também, por via sanguínea.

A transmissão congênita ocorre, principalmente, no curso de uma infecção aguda primária na gestante (Desmonts & Couvreur, 1974; Remington et al., 2006). Entretanto, é a forma que merece mais atenção uma vez que resulta na forma mais grave de infecção. A frequência da transmissão congênita varia de acordo com o período gestacional em que a mãe foi infectada. Assim, infecções adquiridas em torno do período da concepção e dentro das primeiras 10 semanas de gestação, apresentam uma pequena taxa (<5%) de transmissão vertical, enquanto as taxas de transmissão são maiores que 60% quando a infecção materna é adquirida no último trimestre de gestação (Hohlfeld et al., 1994; Dunn et al., 1999; Montoya & Liesenfeld, 2004).

O índice de transmissão por meio de transfusão sanguínea e em pacientes transplantados é menor, mas pode ocorrer desde que o doador apresente taquizoítas ou cistos teciduais com bradizoítas, respectivamente, no interior de suas células ou órgãos. Alguns casos de infecções devido a acidentes laboratoriais foram registrados por Remington & Gentry (1970). Outro problema consiste na reativação

de infecção crônica presente no receptor após o transplante, em virtude das drogas imunossupressoras utilizadas no tratamento (Montoya & Linsefeld, 2004).

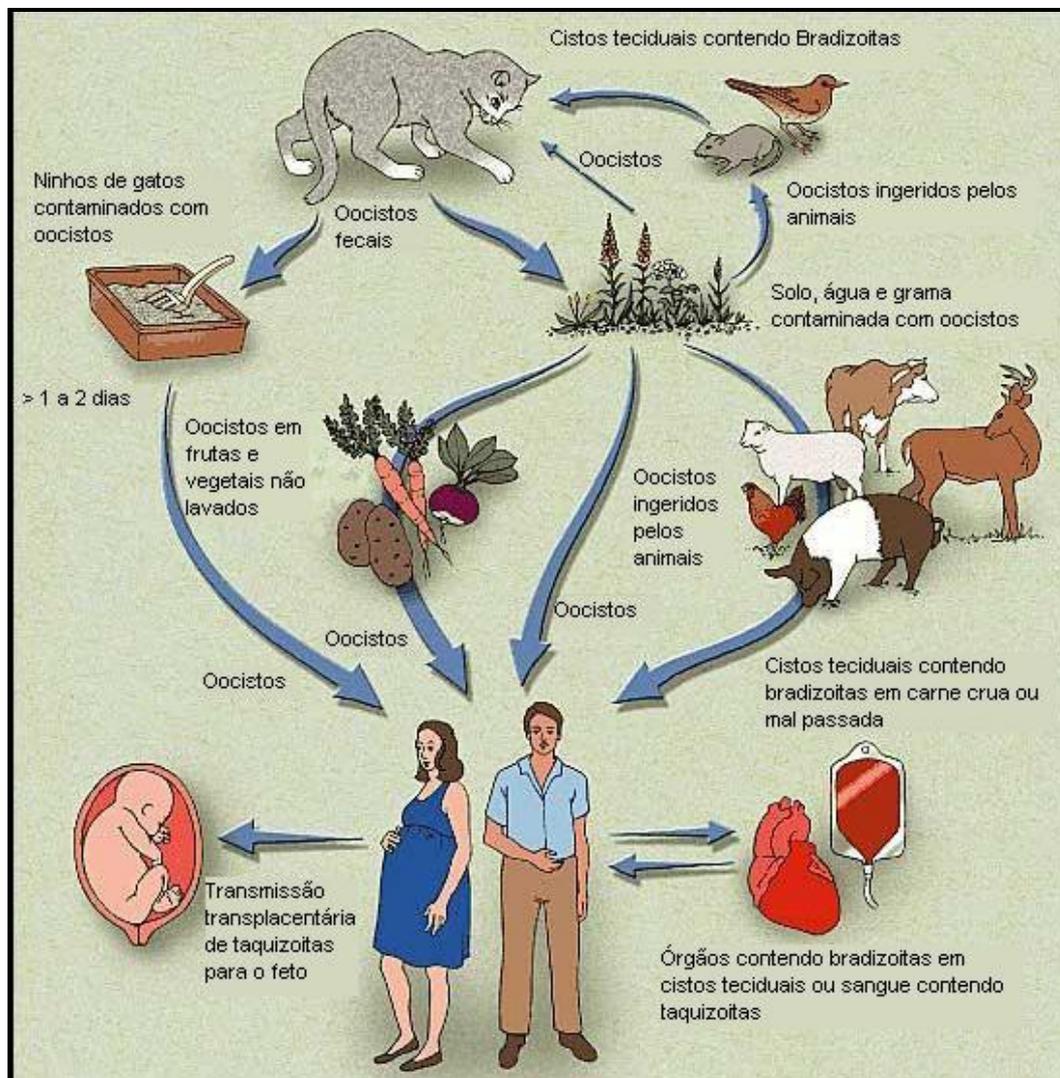


Figura 2: Principais formas de transmissão de *Toxoplasma gondii*.

FONTE: Lynfield & Guerina, 1997, p.76.

6. Diagnóstico Laboratorial da Toxoplasmose

Como a infecção pós-natal por *T. gondii* em indivíduos imunocompetentes origina, na maioria das vezes, a chamada forma latente (crônica) subclínica, o diagnóstico

laboratorial é pouco utilizado nesses casos. Entretanto, ele passa a ter grande valor quando for necessário avaliar se uma fase aguda ocorreu recentemente ou não. Portanto, em algumas situações, torna-se importante o diagnóstico da infecção:

- a) Em **gestantes**, pois no caso de uma fase aguda recente há risco de transmissão materno-fetal, enquanto que uma infecção antiga assegura, geralmente, uma gravidez destituída de risco já que está protegida contra re-infecções;
- b) Em **recém-natos** de mães suspeitas de terem tido a primo-infecção (fase aguda) durante a gestação ou mesmo poucas semanas antes de engravidarem, no sentido de confirmar ou afastar a ocorrência de transmissão congênita;
- c) No caso de indivíduos **imunocomprometidos**, seja pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou por outras causas, quando existe o risco de reativação da infecção por eventual ruptura de cisto pré-existente ou de re-infecção por queda de imunidade.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio da detecção do parasito (**Métodos Diretos**), em amostras biológicas como, sangue, líquor, saliva, humor aquoso e fragmentos de órgãos colhidos por biópsia ou necrópsia, utilizando-se técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e imunohistoquímica ou, ainda, por isolamento dos parasitos mediante inoculação de materiais biológicos em animais de laboratório ou em cultura celular.

No entanto, a detecção de anticorpos específicos contra o parasito presente em soros de pacientes infectados através de testes sorológicos (**Métodos Indiretos**), representa importante papel no diagnóstico da toxoplasmose, visto que a grande maioria dos indivíduos imunocompetentes com infecção aguda é assintomática apesar de que, muitas vezes, a heterogeneidade da resposta imune pode exigir a realização de vários testes para a distinção entre uma infecção recente ou antiga. Com esse objetivo, ao longo dos anos, diversas técnicas têm sido desenvolvidas para se obter um diagnóstico mais preciso da infecção.

O primeiro ensaio sorológico desenvolvido para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* foi a **Reação de Sabin-Feldman** (1948) ou **Teste do Corante**, que apesar da sua

alta sensibilidade e boa reprodutibilidade, hoje é raramente utilizada em virtude do inconveniente de serem utilizados parasitos vivos. O ensaio consiste na incubação do soro-teste em diluições seriadas, com uma suspensão de taquizoítos vivos, complemento e azul de metileno. Na ausência de anticorpos específicos no soro do paciente, os parasitos incorporam o corante tornando-se azuis, enquanto que, na presença de anticorpos os parasitos não incorporam o corante devido à desestruturação de sua membrana celular pela ação do complemento. O resultado é expresso como a maior diluição do soro que impede a coloração dos parasitos. No entanto, ainda hoje, é considerado método sorológico padrão para o diagnóstico da toxoplasmose (Sukthana, 2006).

Posteriormente foi descrito por Jacobs & Lunde (1957), o teste de **Hemaglutinação Indireta**, em que se utilizavam hemácias de carneiro recobertas por componentes do parasito, principalmente citoplasmáticos. Entretanto, apresentava baixa sensibilidade, não detectava anticorpos IgM ou IgG de baixa avidéz, além de sofrer a interferência de anticorpos heterófilos gerando resultados falso-positivos. Contudo, tais falhas foram solucionadas utilizando-se hemácias de aves recobertas com antígenos solúveis (totais) do parasito, aglutináveis por anticorpos IgG e IgM, tornando o teste mais sensível. Pode ser realizado com amostras de soro tratadas e não-tratadas com 2-mercaptoetanol, o que permite a detecção de anticorpos IgM específicos e o diagnóstico de infecção recente. Porém, apesar da simplicidade e da versatilidade, apresenta baixa sensibilidade em relação aos outros testes mas é, ainda, considerado um teste prático, de baixo custo e que não exige equipamento sofisticado para triagem da toxoplasmose.

Outro ensaio para detecção de anticorpos, inicialmente desenvolvida por Fulton & Turk (1959) é o **Teste de Aglutinação Direta (DAT)** que utiliza suspensões de taquizoítas tratados com formalina que se aglutinam na presença de anticorpos específicos. Esse ensaio foi posteriormente modificado passando a se chamar **Teste de Aglutinação Direta Modificada (MAT)** quando se utiliza o 2-mercaptoetanol que destrói anticorpos IgM específicos e não-específicos, detectando somente anticorpos IgG *anti-T. gondii* (Desmonts & Remington, 1980). Outra variação dessa reação, é o **Teste de Aglutinação Diferencial (AC/HS)** para anticorpos IgG *anti-T. gondii*. Baseia-se no achado de que a fixação dos taquizoítos por formalina ou acetona causa diferença, significativa, na afinidade por anticorpos de pacientes com infecção

adquirida recentemente comparada a pacientes cuja infecção ocorreu no passado. O teste AC/HS compara títulos de anticorpos obtidos com taquizoítos de *T. gondii* fixados pela formalina com aqueles obtidos com taquizoítos fixados com acetona. Altos títulos de anticorpos no preparado com acetona estão relacionados a uma infecção aguda recente, enquanto altos títulos encontrados no antígeno fixado pela formalina estão associados a uma infecção passada (Thulliez et al., 1986).

O teste de **Imunofluorescência Indireta (IFI)** descrito por Camargo (1964) por ser de mais fácil execução, substituiu a reação de Sabin-Feldman fornecendo resultados comparáveis, e ainda veio permitir a identificação de anticorpos IgG, IgM e demais imunoglobulinas em função do conjugado utilizado em soros incubados sobre parasitos fixados em lâminas de microscopia. O antígeno utilizado nessa técnica é constituído por taquizoítas intactos, formalizados e fixados em lâminas de vidro para microscopia que revelam uma fluorescência periférica e brilhante após incubação com amostras de soro e conjugados específicos marcados com fluorocromos. Entretanto o ensaio pode, também, apresentar resultados falso-positivos de anticorpos IgM pela interferência de fatores reumatóides, eventualmente presentes no soro ou resultados falso-negativos, devido à competição entre os anticorpos IgG e IgM, impedindo que os anticorpos IgM se fixem aos antígenos parasitários (Camargo et al., 1972). Outra desvantagem é que os resultados são relativamente, subjetivos, o que também dificulta sua utilização em grandes inquéritos epidemiológicos (Camargo, 1964).

Outro ensaio descrito por Desmonts, Naot & Remington (1981) é o **ISAGA**. Na técnica, placas de microtitulação são cobertas com anti-IgM. O soro do paciente, em diluições crescentes, é depositado sobre as cavidades o que permite a captura de IgM. Em seguida é adicionada uma suspensão de taquizoítas. A leitura da aglutinação permite expressar o título da amostra como a diluição mais alta do soro com forte aglutinação. Essa técnica permite, também, a detecção de outras classes de anticorpos por captura e tem grande sensibilidade para IgM, IgA e IgE. Segundo Ashburn et al. (1998), a técnica ISAGA-IgA é sensível e capaz de detectar soroconversão, e ISAGA-IgE positivo, associado à baixa avidéz, confirma infecção aguda, já a IgE negativa, a exclui.

A introdução do ensaio imunoenzimático **ELISA** descrito por Voller et al (1976), Walls et al. (1977), Camargo et al. (1978), Mineo, Camargo & Ferreira (1980) trouxe um grande avanço para o diagnóstico da toxoplasmose, principalmente no que diz respeito à identificação das diferentes classes de imunoglobulinas, muito importante no diagnóstico de infecções recentes e das formas congênitas da toxoplasmose. A detecção de anticorpos IgM anti-*Toxoplasma* representa um marcador sorológico importante, desde que a presença desse isotipo sirva para diferenciar as infecções agudas, das crônicas (Mineo et al., 1986).

A técnica de ELISA indireta, inicialmente descrita, traz algumas desvantagens quando utilizada na pesquisa do anticorpo IgM, como a ocorrência de reações falso-positivas na presença de algumas condições clínicas como, citomegalovirose, rubéola e mononucleose infecciosa, devido a similaridades de alguns determinantes antigênicos (Takahashi & Rossi, 1994) ou à presença de fatores reumatóides e/ou nucleares (Araujo et al., 1971; Camargo et al., 1972; Camargo et al., 1978; Naot & Remington, 1980; van Loon et al., 1983; Mineo et al., 1986), ou reações falso-negativas pela presença de concentrações elevadas de anticorpos IgG apresentando alta avidéz (Naot & Remington, 1980; van Loon et al., 1983; Mineo et al., 1986) que impedem que o anticorpo IgM se ligue aos antígenos da placa.

Contudo, com a introdução do ensaio de ELISA de captura descrito por Mineo et al.(1986), foi possível eliminar tais interferentes na pesquisa dos anticorpos IgM aumentando, ainda mais, a sensibilidade da técnica. Mas, esse aumento de sensibilidade acabou trazendo desvantagens quanto à detecção dos anticorpos IgM persistentes em soros de alguns pacientes por meses, ou mesmo anos, após o início da infecção (Del Bono et al., 1989; Bobić et al., 1991; Liesenfeld et al., 1996; Liesenfeld et al., 1997; Bertozzi et al., 1999; Suzuki et al., 2001). Assim, um resultado positivo nem sempre pode ser interpretado como indicativo de infecção recente, necessitando, então, da realização de ensaios confirmatórios.

Apesar de todos os inconvenientes, ELISA tem sido uma técnica amplamente utilizada nos laboratórios clínicos devido à obtenção de resultados mais objetivos, com custo relativamente baixo e possibilidade de testar grande quantidade de amostras em pequeno espaço de tempo, aliadas à alta sensibilidade e especificidade. No entanto, todos esses parâmetros dependem do tipo de antígeno e

modalidade dos testes utilizados. Assim, no intuito de auxiliar no diagnóstico da infecção primária, principalmente em mulheres grávidas e recém-nascidos, as técnicas imunoenzimáticas têm sido modificadas, utilizando-se de diferentes preparações antigênicas, na busca do aprimoramento dos ensaios para a detecção de anticorpos específicos a esses diferentes antígenos de *T. gondii*. Dentre os antígenos utilizados, vale destacar: antígenos solúveis e totais de taquizoítas, antígenos de taquizoítas fixados com formalina, antígenos excretados e/ou secretados pelo parasito, proteínas nativas purificadas por meio de cromatografia de afinidade utilizando anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes de antígenos imunodominantes dos parasitos.

Segundo Hegab & Al-Mutawa (2003), *T. gondii* pode expressar diferentes antígenos dependendo de sua linhagem. Entretanto existem alguns antígenos que são comuns aos diferentes estágios do ciclo de vida como também há antígenos estágios específicos. Dentro desse grupo de antígenos estão os membros das famílias SAG (Antígeno de superfície) que incluem o antígeno p30 (SAG1 – antígeno de superfície 1), presente em formas taquizoítas e bradizoítas e o antígeno p22 (SAG2 – antígeno de superfície 2), observado somente na superfície de taquizoítas.

Um destaque especial é atribuído ao antígeno p30 (SAG1), principal antígeno de superfície e proteína mais abundante da forma taquizoíta, e que compreende 5% do seu total de proteínas. Esse antígeno encontra-se distribuído na superfície e no interior do taquizoíta, e dentro do vacúolo parasitóforo. É capaz de estimular a produção de altos níveis de anticorpos específicos, pelo sistema imunológico do hospedeiro, tanto em pacientes com infecção aguda, quanto em pacientes com infecção crônica por *T. gondii* (Kasper, Currie & Bradley, 1985; Bulow & Boothroyd, 1991; Letscher-Bru et al., 2003).

Recentemente, Wu et al. (2009) desenvolveram um ensaio imunoenzimático utilizando proteína recombinante truncada SAG1 para diagnóstico da toxoplasmose humana, e encontraram resultados de desempenho superior ao do recombinante SAG1 utilizado por Beghetto et al. (2006). Nesse trabalho foi desenvolvido um ensaio com seis regiões antigênicas de *Toxoplasma gondii* (MIC2, MIC3, M2AP, GRA3, GRA7, e produtos de genes SAG1), desenhado para substituir o antígeno

solúvel de taquizoítos utilizado em testes sorológicos. Entretanto, esse ensaio só conseguiu distinguir os pacientes infectados dos indivíduos saudáveis.

Essa incessante busca por anticorpos que estão presentes apenas na infecção aguda por *T. gondii* tem levado a uma melhora dos testes-diagnósticos com a utilização desses diferentes antígenos, sozinhos ou em combinações. Outro antígeno também utilizado nesses ensaios é a proteína p97 localizada intracelularmente nas formas taquizoíta e bradizoíta que pode, ainda ser encontrada dentre as proteínas secretadas e/ou excretadas pelo parasito (Mineo, Khan & Kasper, 1994).

No ensaio sugerido por Carvalho et al (2008) avaliaram-se a utilização de anticorpos monoclonais num ensaio imunoenzimático (ELISA) reverso para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA contra os antígenos SAG-1, SAG-2 e p97 de *T. gondii* em soros humanos, e os resultados foram comparados aos do ELISA indireto clássico usando antígeno solúvel de *T. gondii* (ELISA-STAg), que se mostraram ferramentas adicionais para um diagnóstico mais seguro da toxoplasmose, particularmente nos casos de infecção primária e congênita.

Antígenos associados à forma bradizoíta também têm sido identificados, como os antígenos BAG e o antígeno MAG1 que é secretado pela matriz do cisto e é reconhecido por soros imunes do hospedeiro (Parmley, Sgarlato & Remington, 1993; Holec et al., 2007).

Algumas proteínas secretórias, associadas ao processo de invasão da célula hospedeira, também têm sido identificadas e associadas à estimulação da resposta imune do hospedeiro como, proteínas de micronemas (MIC), roptrias (ROP) e grânulos densos (GRA). Dentre essas, a proteína ROP2 foi utilizada por Martin et al. (1998) que demonstraram que o antígeno recombinante ROP2 induz forte resposta humoral no início da infecção, o que pode ser útil em sistemas diagnósticos em combinação com outros antígenos do parasita para detectar anticorpos das classes IgG, IgA e IgM.

O antígeno recombinante do grânulo denso do taquizoíta GRA6, também mostrou alta especificidade para distinguir infecção recente de infecção passada. O antígeno GRA6 está presente, apenas, durante a fase de divisão de taquizoítas e de invasão

das células do hospedeiro portanto, anticorpos contra esse antígeno devem atingir níveis elevados no início da resposta imune desaparecendo, em média, em oito semanas (Redlich & Müller, 1998).

Entretanto, Ferrandiz et al (2004) ao avaliarem os antígenos GRA1 e GRA6 no ELISA recombinante com o objetivo de diferenciar o perfil sorológico entre mulheres grávidas com infecção recém-adquirida, daquelas com infecção crônica, encontraram resultados que sugerem que nem o GRA1 e nem o GRA6 são sensíveis o bastante para serem usados rotineiramente para diferenciar infecções agudas das crônicas, causadas por *T. gondii*.

Pietkiewicz et al. (2004) verificaram o uso dos antígenos recombinantes SAG1, GRA1 e GRA7 como ferramentas para a detecção de IgG anti-*T. gondii* em pacientes com toxoplasmose aguda e crônica. Foi demonstrado que o epítipo GRA7 está mais correlacionado à toxoplasmose aguda.

Segundo Golkar et al. (2007), ao estudarem o antígeno GRA2, proteína altamente imunogênica, encontraram vantagens quanto a sua utilização para o diagnóstico sorológico da infecção aguda por *Toxoplasma*.

Mais recentemente, Holec-Gasior, Kur & Hiszczyńska-Sawicka (2009), utilizaram os antígenos recombinantes GRA2 combinados com ROP1 e, corroborando com dados anteriores, encontraram resultados que sugerem que os anticorpos IgG contra os antígenos GRA2 e ROP1 são produzidos durante a fase aguda da toxoplasmose, mas são incomuns na fase crônica da infecção. Assim, essas proteínas recombinantes poderiam ser utilizadas como marcadores específicos para diferenciar entre infecções agudas e crônicas.

Suzuki et al. (2000) examinaram a eficácia da detecção de anticorpos dirigidos contra outro antígeno recombinante, a proteína P35 de *T. gondii*, para sorodiagnóstico de infecção aguda em mulheres grávidas, utilizando ELISA duplo sanduíche, mas a técnica pareceu ser útil, apenas, para diferenciar infecção recém-adquirida, daquelas que foram adquiridas num passado distante.

Outra técnica imunoenzimática muito utilizada é o **ELFA** (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*), teste automatizado no sistema VIDAS[®] (bioMérieux, Lyon,

França) utilizado para a detecção de anticorpos da classe IgG e IgM anti-*T. gondii* e pesquisa da avidéz de IgG. O princípio da reação associa o método imunoenzimático que se baseia na detecção de fluorescência emitida por um produto gerado pela ação enzimática após a incidência de um feixe de luz de comprimento de onda adequado. O sistema VIDAS® para toxoplasmose utiliza o princípio da captura de anticorpos para detecção de IgM, e um sistema indireto para a detecção da IgG e determinação da sua avidéz.

Devido às dificuldades encontradas na sorologia convencional em se fazer uma clara distinção entre infecção primária recente e infecção crônica pelo *T. gondii* (Lappalainen & Hedman, 2004), e à tendência do anticorpo IgM específico em persistir por longo tempo em altos níveis, verificadas em vários estudos (Del Bono et al., 1989; Bobić et al., 1991; Liesenfeld et al., 1996; Liesenfeld et al., 1997; Bertozzi et al., 1999; Suzuki et al., 2001), em 1989 surgiu um teste para medir a avidéz dos anticorpos IgG, proposto por Hedman e cols, que se mostrou um procedimento útil, especialmente em combinação com os testes sorológicos convencionais até então utilizados.

O ensaio baseia-se na propriedade de maturação da afinidade funcional da reação antígeno-anticorpo (Ag/Ac), uma vez que 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. Nos primeiros 3 a 4 meses de infecção, a afinidade da ligação do complexo Ag/Ac é baixa e o tratamento do soro com substâncias desnaturantes (uréia a 6M) consegue dissociar o complexo Ag/Ac. A afinidade na ligação aumenta com o decorrer dos meses, de modo que a presença de anticorpos de alta avidéz afasta o diagnóstico de doença aguda.

Avidéz baixa de IgG anti-*T. gondii* foi apontada como forte indicador de infecção primária materna, numa única amostra por Lappalainen et al. (1995). Os autores estendem o diagnóstico de infecção aguda a gestantes IgM positivas com baixa avidéz de IgG específica e, recomendam a PCR no líquido amniótico para verificar se houve infecção fetal.

Segundo Jenum, Stray-Pedersen & Gundersen (1997), de 92 amostras IgM positivas com níveis de IgG superiores a 300 UI/ml, sugestivas de infecção recente, 72,8%

têm avides de IgG alta, o que indica que a infecção é de mais de 20 semanas. Segundo esses autores a introdução da alta avides como critério de exclusão de infecção aguda faz com que muitas gestantes sejam poupadas de exames desnecessários, tratamento e ansiedade. Já a persistência de IgM e de IgG de baixa avides em algumas mulheres infectadas sugere que a resposta imune possa ser mais demorada nesses casos.

Pelloux et al. (1998) avaliaram 356 soros, incluindo 42 soros sequenciais obtidos de soroconversão em gestantes, com uma adaptação do sistema VIDAS® (bioMérieux, Lyon, França), usando uréia 6M como agente de dissociação, e concluíram que um índice de avides alta permitiu excluir infecção recente nos quatro meses que precederam à coleta.

Posteriormente, Beghetto et al. (2003) avaliaram a avides de anticorpos IgG dirigidos contra os antígenos recombinantes GRA3, GRA7, MIC3 e SAG1 para discriminação entre as fases, aguda e latente, da infecção por *T. gondii*, e os resultados mostraram alguma utilidade no diagnóstico da doença aguda.

Apesar de todos os avanços, a utilização dessa técnica possui algumas limitações: a) anticorpos de IgG de baixa avides podem persistir por vários meses (Pelloux et al., 1998; Cozon et al., 1998); b) resultados duvidosos são frequentes e ocorrem em até 26,4% dos casos (Liesenfeld et al., 2001); c) mais de 50% das gestantes brasileiras fazem a primeira consulta pré-natal após o segundo trimestre (Vaz et al., 1990), quando o teste de avides é incapaz de afastar ou confirmar infecção ocorrida durante a gestação; d) a técnica necessita de uma boa padronização para permitir uma definição individual em gestantes suspeitas que deveriam sofrer procedimentos invasivos ou terapia agressiva (Camargo et al., 1991). Portanto, a sua utilização é limitada à detecção de anticorpos de alta avides no primeiro trimestre da gestação, o que afasta a possibilidade de primo-infecção na gravidez.

Embora vários estudos têm sido realizados no sentido de desenvolver testes-diagnósticos capazes, não apenas, de diagnosticar a toxoplasmose, como também de diferenciar a doença aguda da crônica, o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda ainda apresenta algumas lacunas, principalmente no que diz respeito à persistência dos anticorpos contra *T. gondii* em indivíduos saudáveis. Assim,

resultados positivos nos testes para pesquisa dos anticorpos IgG e IgM não representam, necessariamente, diagnóstico de infecção recém-adquirida. Os anticorpos IgG podem ser detectáveis durante toda a vida de alguns indivíduos, e anticorpos IgM podem ser detectáveis por muitos anos em determinados pacientes.

Devido a todas às limitações apresentadas, ainda se faz necessário o desenvolvimento de novas metodologias de alta sensibilidade, que não sofram interferência da alta prevalência de anticorpos IgG e IgM persistentes por longo período, e que sejam capazes de estabelecer diagnóstico precoce da toxoplasmose.

Martins-Filho et al. (1995) descreveram uma nova metodologia de imunofluorescência indireta baseada em citometria de fluxo para detectar a reatividade residual de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em pacientes submetidos ao tratamento para doença de Chagas e, assim, utilizar esse ensaio para monitorar a cura pós-terapêutica. Posteriormente, Rocha et al. (2002) reportaram a aplicabilidade dessa metodologia para detectar anticorpos IgG anti-*Leishmania (V.) braziliensis* e sua utilidade no diagnóstico da leishmaniose cutânea. Além desses estudos, outros relatos têm demonstrado claramente a aplicabilidade dessa metodologia baseada em citometria de fluxo no diagnóstico sorológico de várias infecções e outras situações clínicas (Rocha et al., 2006; De Andrade et al., 2007; Vitelli-Avelar et al., 2007). Recentemente, nosso grupo descreveu a utilidade dessa metodologia na detecção de anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi* e sua aplicabilidade na avaliação de cura pós-terapêutica em pacientes portadores de leishmaniose visceral, como também, na detecção de anticorpos anti-*Leishmania (L.) amazonensis* e seu elevado desempenho no diagnóstico da leishmaniose tegumentar (Lemos et al., 2007; Pissinati et al., 2008).

Portanto, considerando esses achados, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho do ensaio de imunofluorescência indireta baseada em citometria de fluxo na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* e sua utilização como uma ferramenta alternativa para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana.

Objetivos

1. Objetivo Geral

Avaliar o desempenho da reação de imunofluorescência indireta, baseada em citometria de fluxo, para pesquisa de anticorpos anti-formas taquizoítas fixadas de *Toxoplasma gondii* (AATF), no diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana.

2. Objetivos específicos

1. Padronizar a reação de imunofluorescência indireta, baseada em citometria de fluxo, para de pesquisa de AATF IgM, IgG e subclasses de IgG e avides de IgG, por citometria de fluxo, no diagnóstico da toxoplasmose aguda humana;
2. Estabelecer os critérios de interpretação e o desempenho da reação de imunofluorescência indireta, baseada em citometria de fluxo para a pesquisa AATF IgM, IgG e subclasses de IgG e avides de IgG aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica;
3. Avaliar a aplicabilidade da pesquisa de AATF IgM na segregação sorológica de pacientes com toxoplasmose aguda e pacientes portadores de outras condições clínicas;
4. Analisar comparativamente o desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por citometria de fluxo e pelo sistema VIDAS® TOXO (ELFA – *Enzyme Linked Fluorescent Assay*) no diagnóstico da toxoplasmose aguda e na exclusão da toxoplasmose crônica;
5. Estabelecer um algoritmo para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana utilizando citometria de fluxo.

Pacientes e Métodos

1. Aspectos Éticos

Este estudo faz parte do projeto: “Dinâmica de marcadores sorológicos na infecção aguda recente pelo *Toxoplasma gondii*” desenvolvido pela Prof^a Geisa Baptista Barros e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFES em reunião ordinária no dia 30/03/2005 (ANEXO A). Todos os voluntários ou seus representantes legais assinaram o termo de consentimento pós-informação antes do início do estudo.

2. Amostras de soros

Foram utilizadas 82 amostras de soros humanos, do banco de soros do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI/UFES), que foram coletados de pacientes portadores de toxoplasmose aguda que fizeram parte de um estudo longitudinal e foram seguidos por 12 meses (\pm 30 dias). As amostras foram distribuídas em três grupos, de acordo com o perfil sorológico da infecção por *T. gondii*, determinado por meio de ensaios sorológicos convencionais. De acordo com os resultados obtidos nesses ensaios, e conforme os critérios de seleção, os grupos foram:

Grupo I – Infecção Aguda (AG): 30 amostras de soro de pacientes com presença de sinais ou sintomas compatíveis com infecção por *Toxoplasma gondii* e perfil sorológico típico de infecção aguda (IgG e IgM anti-*Toxoplasma* positivos e presença de IgG de baixa avidéz) coletados até dois meses após o início dos sintomas (\pm 15 dias).

Grupo II – Infecção Crônica (CR): 30 amostras de soro dos mesmos pacientes do Grupo I, coletados 12 meses após o início dos sintomas.

Grupo III – Indivíduos não-infectados (NI): 22 amostras de soro de indivíduos saudáveis com sorologia negativa para *T. gondii* (ausência de anticorpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma*).

Adicionalmente, também foram testadas 51 amostras de pacientes portadores de outras condições clínicas, obtidas em bancos de soros de laboratórios clínicos

convencionais: Doenças de Chagas (CH, n=10), Malária (MAL, n=10), Leishmaniose Visceral (LV, n=5), Tuberculose (TB, n=10), Citomegalovírus (CMV, n=3), Epstein Barr (EBV, n=3), Herpes simples (HSV, n=2), Rubéola (RUB=3) e Fator anti-nuclear (FAN, n=5).

3. Pesquisa de anticorpos anti-formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* por citometria de fluxo

3.1 Manutenção e obtenção das formas taquizoítas de *T. gondii*

Parasitas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Balb/C, através de passagens seriadas a intervalos de 48 a 72 horas de um inóculo de, aproximadamente, 10^6 taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (Mineo et al., 1980). Os exsudatos peritoneais foram obtidos por meio de lavagem da cavidade abdominal do animal com solução salina estéril, tamponada com fosfatos a 0,01 M PBS (0,15M, 8,0g/l de NaCl, 0,2g/l de KCl, 0,24g/l de KH_2PO_4 e 1,15g/l de Na_2PO_4 , pH 7,2). Em seguida, as suspensões parasitárias foram submetidas a uma centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover debris celulares do hospedeiro. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C) com PBS. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspenso em 10 mL de PBS e os parasitas contados em câmara hemocitométrica.

3.2 Preparo das formas taquizoítas fixadas de *T. gondii*

As suspensões parasitárias preparadas, como descrito anteriormente, foram tratadas com solução fixadora (10,0g/L de paraformaldeído, 10,2g/L de cacodilato de sódio e 6,65g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) diluída 1:1 em PBS e mantida a 4°C (Martins-

Filho et al.,1995). Após 24 horas foram centrifugadas a 1000xg, 4°C por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 10mL de PBS. Posteriormente, procedeu-se a contagem do número de parasitos, e a suspensão celular foi ajustada para 5×10^6 taquizoítas/mL para utilização nos ensaios de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo.

3.3 Anticorpos reveladores utilizados para os ensaios de citometria de fluxo

Os anticorpos reveladores utilizados nos ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou biotina foram obtidos da Sigma Chemical Corp., St Louis, MO, EUA; e o reagente secundário SAPE (estreptoavidina-ficoeritrina) foi obtido da SouthernBiotech Associates, Birmingham, AL.

A relação dos anticorpos, sua especificidade, procedência, diluições nos ensaios e diluições dos soros dos pacientes estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.

Anticorpo	Diluição	Clone	Especificidade	Origem	Marcação	Diluição do soro
AcM anti IgM	1:2.000	-	Cadeia μ	Cabra	FITC	1:2.000-1:128.000
AcP. Anti IgG	1:20.000	-	Fragmento Fc	Cabra	FITC	1:32.000-1:2048.000
AcM. Anti IgG ₁	1:20.000	8c/6-39	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:32.000-1:2048.000
AcM. Anti IgG ₂	1:1.000	HP-6014	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:400-1:25.600
AcM. Anti IgG ₃	1: 2.000	HP-6050	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:2.000-1:128.000
AcM. Anti IgG ₄	1: 1.000	HP-6025	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:400-1:25.600

AcM. = anticorpo monoclonal; AcP. = anticorpo policlonal

FITC = isotiocianato de fluoresceína

*AcM. biotinilados foram posteriormente incubados com estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE) para detecção.

3.4 Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo para pesquisa de anticorpos IgM, IgG e subclasse de IgG

No momento do uso as amostras de soro foram descongeladas, diluídas em solução salina tamponada PBS (pH 7,2) suplementado com 3% de soro fetal bovino SFB (PBS-3%SFB).

Os ensaios de imunofluorescência para o estudo de AATF foram realizados segundo o protocolo descrito por Lemos et al. (2007). O experimento foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços com fundo em “U” (Nunc, Dinamarca), adicionando-se 50ul do soro diluído, juntamente com 50ul da suspensão de parasitas ($5,0 \times 10^6$ /ml) e incubados a 37°C por 30 minutos. Os parasitos foram lavados duas vezes com 200ul PBS-3%SFB, por centrifugação a 1.000g, 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante, desprezado. Posteriormente, os parasitos foram incubados com 50ul de anticorpo anti-IgG ou anti-IgM marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluído em PBS- 3%SFB, a 37°C durante 30 minutos, ao abrigo da luz. Para a detecção de anticorpos das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), após incubação dos soros com os parasitos a 37°C por 30 minutos e lavagem duas vezes com PBS-3%SFB, foi adicionado 50ul de anticorpo anti-subclasses de IgG humana marcado com biotina, diluído em PBS-3%SFB, seguida por duas lavagens com PBS-3%SFB. Em seguida, os parasitos foram incubados a 37°C por 30 minutos, na presença de 20ul de SAPE, diluído 1:400 em PBS-3%SFB. Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes e o sobrenadante desprezado. Os parasitos foram, então, novamente fixados com 200ul de solução fixadora e a microplaca mantida a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento da leitura da fluorescência no citômetro de fluxo, que não ultrapassou 24 horas.

Para cada ensaio foi feito um controle interno da reação para avaliar a ligação inespecífica do anticorpo secundário. Os parasitos foram incubados na ausência de soro humano porém, na presença do anticorpo secundário. Em todos os testes foram incluídas amostras de soros controles positivos e negativos para toxoplasmose. Os resultados foram expressos em Porcentagem de Parasitos Fluorescentes Positivos (PPFP).

Para determinação das diluições ótimas a serem utilizadas nos ensaios foram realizadas titulação em bloco dos soros controles positivos e soros controle negativo, e do conjugado.

3.5 Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo para pesquisa da avidéz de anticorpos IgG

O ensaio de avidéz de IgG por citometria de fluxo foi realizado conforme descrito anteriormente com algumas modificações. O experimento foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços com fundo em “U” (Nunc, Dinamarca), em duplicata em placas separadas, adicionando-se 50ul do soro diluído, nas mesmas diluições anteriores, juntamente com 50ul da suspensão de parasitas ($5,0 \times 10^6$ /ml) e incubados a 37°C por 30 minutos. Os parasitos foram lavados uma vez com 200ul PBS-3%SFB por centrifugação a 1.000 x g, 4°C durante 10 minutos. Em seguida foi realizada uma lavagem diferencial, sendo que uma das placas foi incubada com solução de uréia 6M diluída em PBS-3%SFB, por 5 minutos, enquanto a outra placa foi incubada somente com PBS-3%SFB e, posteriormente, submetidas à centrifugação a 1.000 x g, 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante, desprezado. Após nova lavagem com 200ul PBS-3%SFB, a reação foi revelada como descrito no ensaio de citometria para pesquisa de anticorpos IgG. As diluições dos soros foram as mesmas utilizadas nos ensaios para a pesquisa de anticorpos IgG.

Os resultados foram expressos em Índice de Avidéz (IA) e calculados como a razão entre os valores de Porcentagem de Parasitos Fluorescentes Positivos (PPFP) obtidos das amostras tratadas com uréia (U^+) e as amostras não tratadas (U^-), segundo a fórmula: $IA (\%) = [PPFP(U^+) / PPFP (U^-)] \times 100$. Para a determinação do índice de avidéz foi utilizada a última diluição do soro que apresentava valores de $PPFP > 30\%$.

3.6 Aquisição e análise dos dados da citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite a avaliação de características morfométricas e fluorescentes de células individuais. Através de um sistema ótico eletrônico é possível avaliar a emissão de fluorescência, bem como a dispersão de raios *laser* incidentes sobre uma célula, possibilitando a análise de três parâmetros: tamanho (FSC-*Forward Scatter*), complexidade interna ou granulosidade (SSC-*Side Scatter*) e emissão de fluorescência.

A aquisição e a análise dos dados foram realizadas no citômetro de fluxo FACSort (Becton Dickinson), empregando o software Cell-Quest. Para cada amostra individual, foram adquiridas informações relativas aos parâmetros: tamanho, granulosidade e intensidade relativa de fluorescência, analisando-se 5.000 parasitos. A Figura 3 mostra a distribuição característica e homogênea das formas taquizoítas apresentadas em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), permitindo o posicionamento de um marcador sobre a população de interesse (R1). Esse perfil foi obtido ajustando-se os ganhos de tamanho e granulosidade, em escala log, com valores E00 e 300, respectivamente. Utilizando-se histogramas de intensidade de fluorescência em função de número de parasitos, foi possível analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada. Dois tipos de anticorpos marcados foram usados nos ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo: anticorpos marcados com FITC ou marcados pelo sistema biotina/SAPE. Quando excitados, os anticorpos marcados com FITC, emitem fluorescência verde (FL1 - fluorescência tipo 1), enquanto anticorpos marcados pelo sistema biotina/SAPE, emitem fluorescência laranja (FL2 - fluorescência tipo 2).

Para cada experimento foi estabelecido um limiar de positividade, de no máximo 2%, em função da curva de fluorescência do tubo controle sem soro (M1, Figura 3B). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador, foram obtidos os valores de porcentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) para cada amostra individual (Figura 3C e D). Para cada conjunto de ensaios o marcador M1 foi posicionado empregando o controle sem soro daquele experimento.

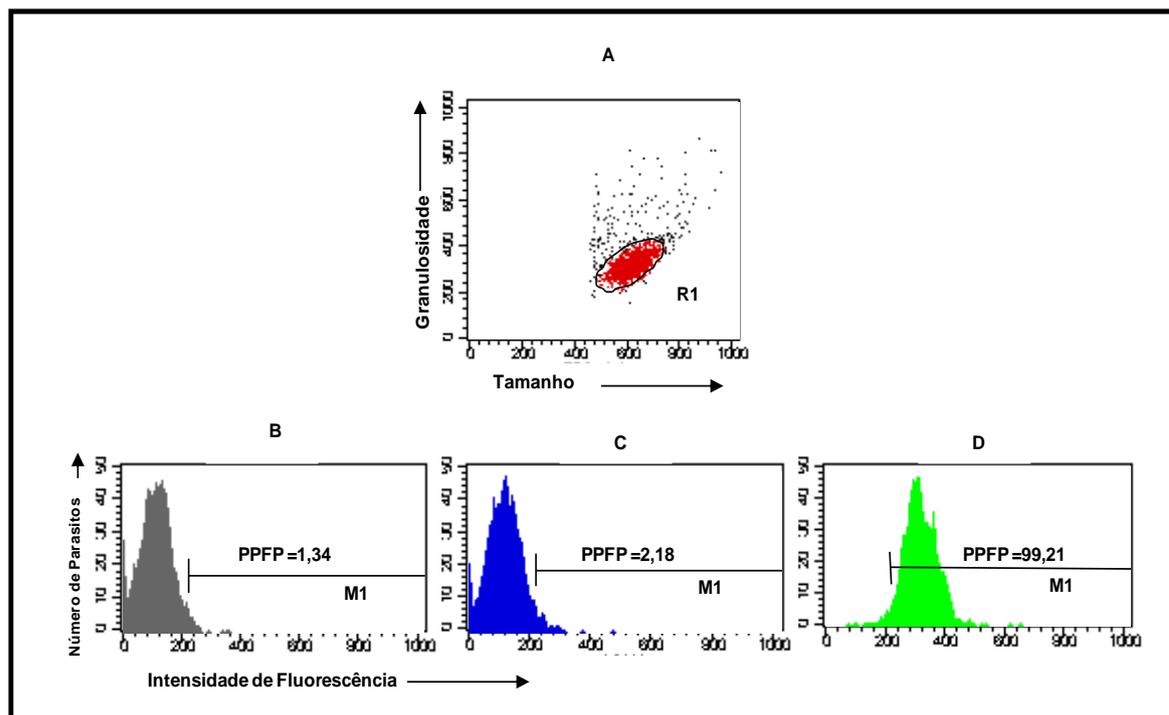


Figura 3 - Sequência de análise de anticorpos anti-taquizoítas fixados de *T. gondii* por citometria de fluxo. Seleção da população de formas taquizoítas, em gráficos de tamanho e granulosidade (A). Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PFPF) obtidos como controle da reação, sem soro (B), após a incubação com um soro negativo (C) e com soro positivo (D). O posicionamento do marcador (M1) segue o critério de se obter, no máximo, 2% de PFPF para o controle da reação.

4 Pesquisa de anticorpos IgG, IgM e avidéz de IgG anti- *T. gondii* por ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*)

4.1 Pesquisa de IgM

Foi utilizado o teste VIDAS[®] TOXO IgM II (bioMérieux) que é uma análise quantitativa, totalmente automatizada, empregando o método imunoenzimático por imunocaptura, com detecção final em fluorescência (ELFA). A fase sólida do teste desenvolve-se num cone que também serve como sistema de pipetagem, e os reagentes da reação imunológica estão prontos para serem utilizados num barrete contendo 10 poços. O valor do sinal de fluorescência é proporcional à concentração do anticorpo presente na amostra, e o resultado final é impresso depois de calculado automaticamente pelo aparelho em relação a uma curva de calibração memorizada.

Resultados com valores $<0,55$ UI/ml são considerados negativos, $>0,65$ UI/ml são positivos e os de $0,55$ a $0,65$ UI/ml são duvidosos.

4.2 Pesquisa de IgG

Um teste similar ao descrito acima foi utilizado para a detecção de anticorpos IgG VIDAS[®] TOXO IgG II (bioMérieux). Resultados <4 UI/ml são considerados negativos; ≥ 8 UI/ml positivos e valores de 4 a 7 UI/ml são duvidosos

4.3 Pesquisa da Avidéz de IgG

Foi utilizado o teste de avidéz de IgG por imunoensaio enzimático duplo sanduíche (*two-step enzyme immunoassay sandwich method*) com sistema de detecção final fluorescente (ELFA). Esse teste é executado em equipamento automatizado VIDAS[®] (bioMérieux) que também efetua os cálculos e a interpretação dos resultados como: <0.200 , baixa avidéz; 0.200 a <0.300 , avidéz intermediária; ≥ 0.300 , alta avidéz.

5 Análise do Desempenho da Metodologia (IFI/CF) para o Diagnóstico da Toxoplasmose aguda humana

5.1 Análise da Curva ROC - *Receiver Operating Characteristic Curve*

Para a obtenção dos valores de sensibilidade e especificidade para o método diagnóstico avaliado foi necessária a definição de pontos de corte, ou seja, um valor que permitisse classificar os resultados do teste como positivos ou negativos. Para cada ponto de corte estabelecido obteve-se uma sensibilidade e uma especificidade

correspondente. A definição do ponto de corte deve ser feita levando-se em conta os propósitos do teste e as implicações dos resultados errôneos, falso-positivos e falso-negativos. Portanto, deve haver um contrabalanço entre a sensibilidade e a especificidade. Para os ensaios de citometria de fluxo, os pontos de corte foram definidos através da construção da *receiver operating characteristic curve* – curva ROC.

A curva ROC foi utilizada neste estudo para a determinação do ponto de corte ideal, bem como para a avaliação da acurácia global da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por citometria de fluxo no diagnóstico da toxoplasmose aguda. As curvas ROC foram obtidas utilizando-se o programa MedCalc Statistical.

A curva ROC consiste na representação gráfica da sensibilidade (verdadeiro-positivo) no eixo vertical, e o complemento da especificidade (falso-positivo) no eixo horizontal para diferentes pontos de corte do teste diagnóstico avaliado. Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte determinando, assim, a área sob a curva (ASC). A ASC representa a acurácia global do teste. Quanto maior a ASC, o que significa mais próximo do valor 1, melhor é o desempenho do método avaliado. Conforme sugere Swets (1988), em função do valor da ASC pode-se classificar o teste de diagnóstico como: sem valor ($ASC=0,5$), de baixa acurácia ($0,5 < ASC \leq 0,7$), de moderada acurácia ($0,7 < ASC \leq 0,9$), de elevada acurácia ($0,9 < ASC \leq 1$) e como teste perfeito ($ASC=1$).

A Figura 4 mostra uma representação esquemática de uma curva ROC onde dois testes diagnósticos hipotéticos são comparados. A análise dos valores da ASC de cada teste permite a conclusão de que o teste 1 ($ASC= 0,98$) é mais eficiente que o teste 2 ($ASC= 0,78$) por apresentar maior ASC, ou seja, possui melhor capacidade para diferenciar dois grupos (doentes e não-doentes).

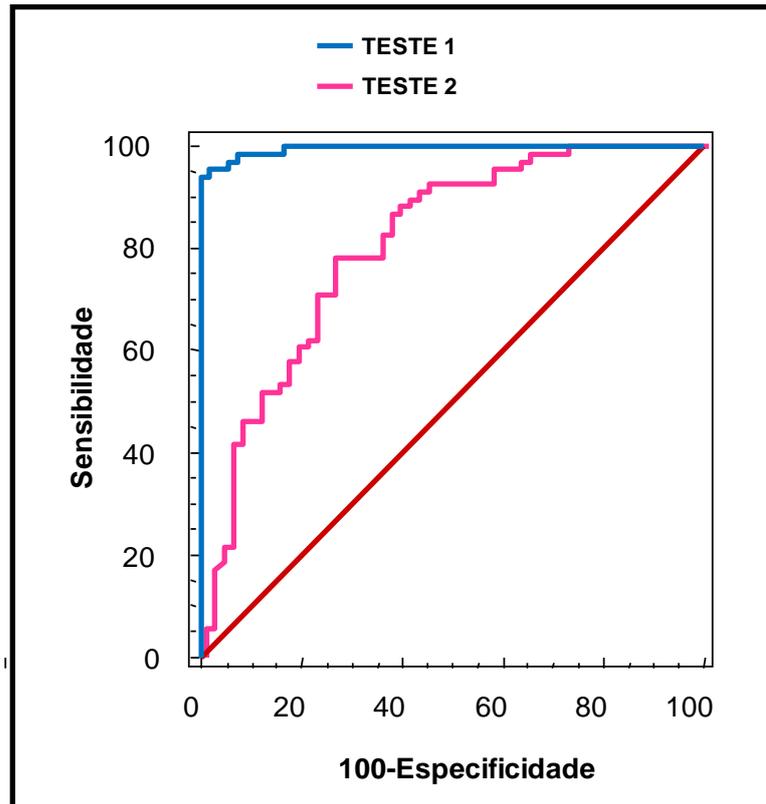


Figura 4 - Curva ROC dos testes 1 e 2 construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100 - especificidade) dos testes avaliados. Os resultados estão expressos pelos pontos dos gráficos que representam os valores dos respectivos índices e delimitam a área sob a curva (ASC) para o teste 1 (ASC= 0,988) e para o teste 2 (0,784).

Resultados

1. Estabelecimento dos critérios de interpretação da pesquisa de AATF IgM aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica

1.1 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana

Foram executados ensaios de reatividade de anticorpos IgM anti-formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* em soros individuais de pacientes do grupo AG (n= 30) e indivíduos do grupo NI (n= 22). Os soros foram incubados nas diluições 1:2.000, 1:8.000, 1:32.000 e 1:128.000, com taquizoítas fixados, nas condições previamente padronizadas. A revelação da ligação de anticorpos IgM a determinantes antigênicos do parasito foi realizada pela utilização de anticorpos monoclonais anti-cadeia μ específica, conjugados ao FITC, conforme descrito na metodologia (Tabela 1).

A Figura 5 mostra os resultados da análise da reatividade de IgM anti-formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* expressos como PFP (Porcentagem de parasitos fluorescentes positivos) em amostras individuais dos pacientes AG (A) e dos indivíduos NI (B). Observa-se que os valores de PFP das curvas de titulação de IgM para os pacientes AG e indivíduos NI apresentam perfis distintos. Foram encontrados altos níveis de reatividade para os pacientes AG até a diluição 132.000. Por outro lado, foi observada uma alta reatividade para os indivíduos NI apenas na primeira diluição (1:2.000), enquanto que, para as demais diluições, foram observados baixos níveis de reatividade.

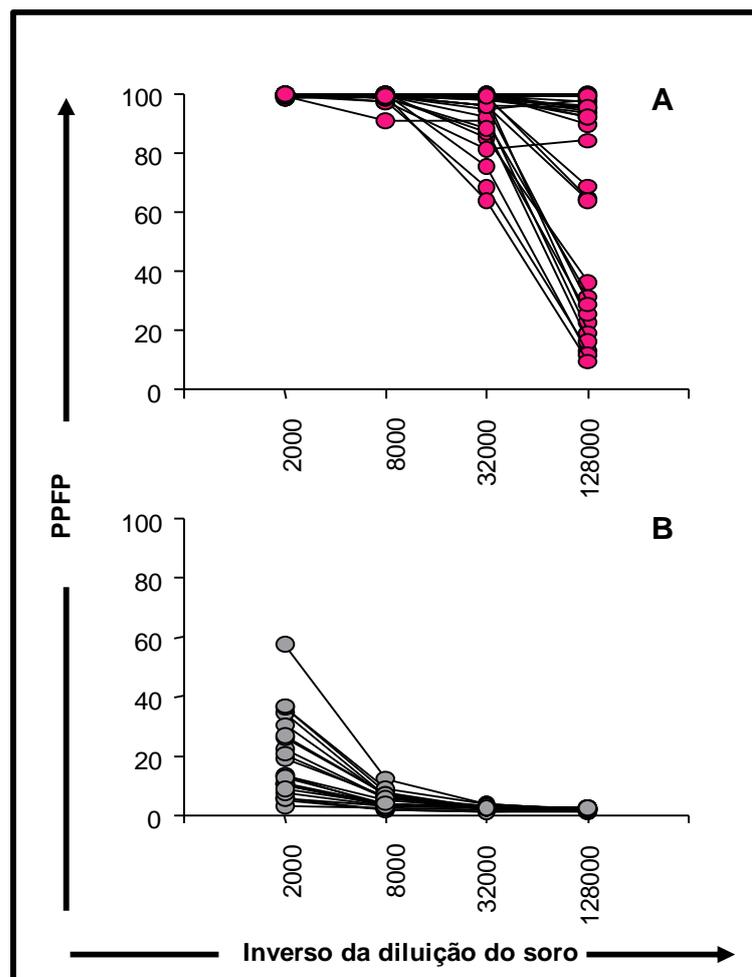


Figura 5 – Curva de reatividade de IgM anti- formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* presentes em soros (A) de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) de indivíduos não-infectados NI (●). Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFP.

A partir dos valores de PFP obtidos para cada grupo testado nas diferentes diluições do soro foi traçada a curva de reatividade média. Com base nos valores diferenciais entre a reatividade dos grupos (delta PFP) foi possível verificar segregação entre os grupos avaliados. Quanto maior o valor delta, melhor é a segregação de reatividade dos grupos. Pode-se observar pela Figura 6 que, em todas as diluições, os grupos apresentaram excelente segregação, mas os melhores valores de delta, superiores a 70%, corresponderam às diluições do soro de 1:2.000, 1:8.000 e 1:32.000.

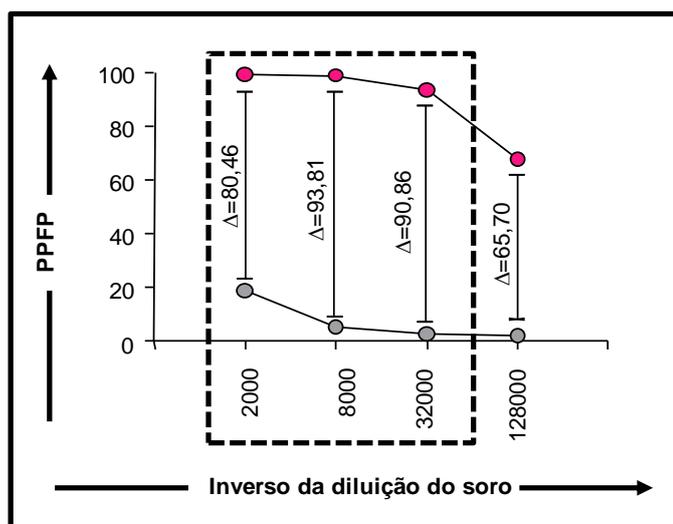


Figura 6 – Avaliação da amplitude (delta - Δ) de segregação entre as reatividades médias de IgM dos soros de pacientes com Toxoplasmose aguda AG (●) e de indivíduos não-infectados NI (○), com os respectivos valores de Δ . A área delimitada equivale às diluições cujos Δ foram superiores a 70%.

Depois de obtidas as melhores diluições do soro com base nas curvas de titulação de IgM e a diferença de reatividade (Δ), os valores individuais dos grupos de pacientes foram trabalhados nas diluições testadas a fim de se construir a curva ROC e avaliar os índices de desempenho da nova metodologia aplicada ao diagnóstico sorológico da Toxoplasmose aguda (Tabela 2).

Tabela 2: Índices de desempenho obtidos através da curva ROC para as diluições avaliadas dos soros

Diluição	Ponto de Corte (%)	Sensibilidade (%)	IC 95%	Especificidade (%)	IC 95%
1:2000	60	100,0	87,9-100,0	100,0	84,4-100,0
1:8000	40	100,0	88,3-100,0	100,0	84,4-100,0
1:32000	40	100,0	88,3-100,0	100,0	84,4-100,0

As curvas ROC da pesquisa de AATF IgM aplicada aos pacientes AG e indivíduos NI estão representadas na Figura 7. A análise dos resultados das curvas ROC mostrou um excelente desempenho da pesquisa de AATF IgM para todas as diluições avaliadas, apresentando valores de sensibilidade e especificidade de 100% e acurácia global (ASC) de 1,0 ($IC_{95\%} = 0,93-1,0$) Conforme a classificação sugerida

por Swets (1988), o valor de ASC de 1,0 indica uma acurácia perfeita da metodologia.

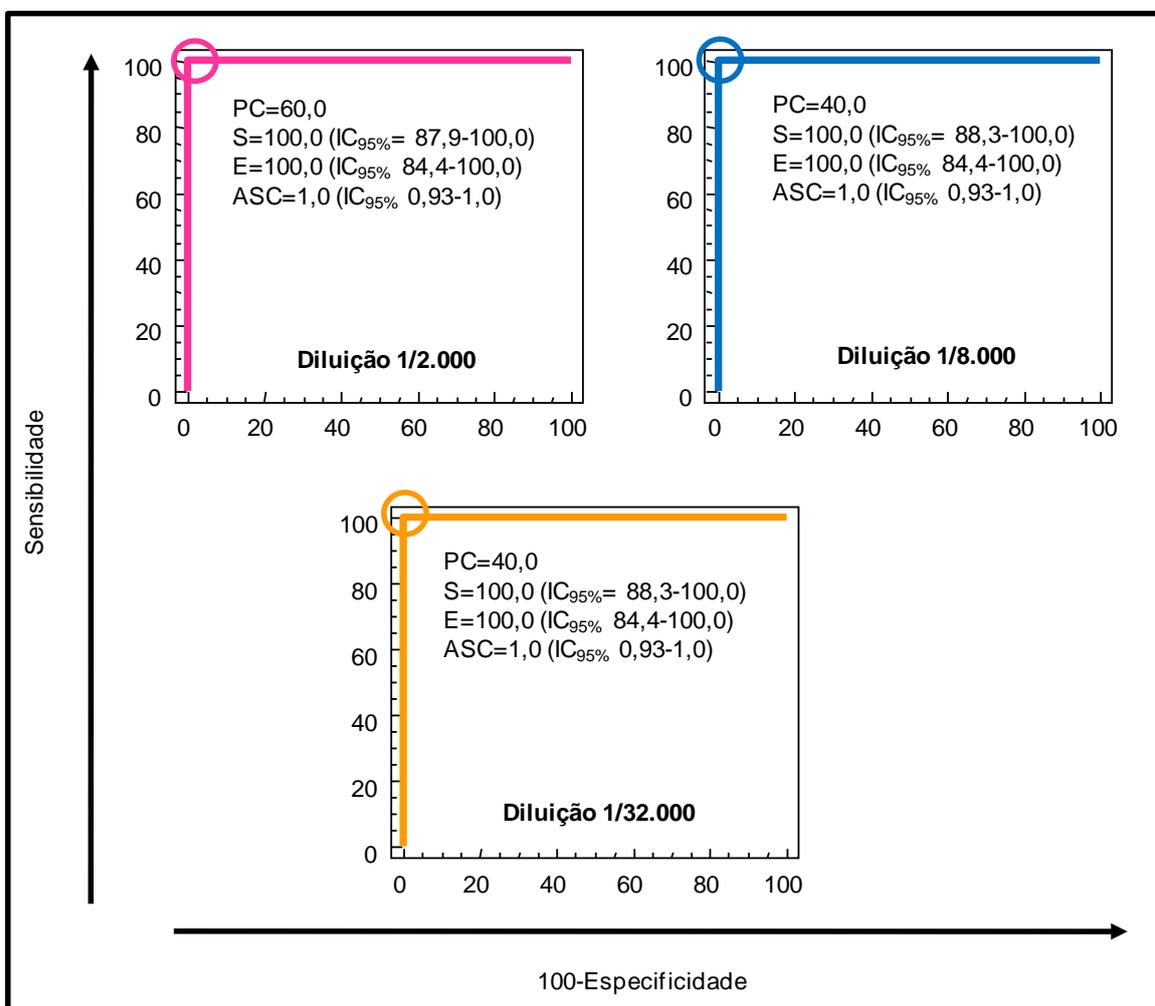


Figura 7 – Curvas ROC da pesquisa de AATF IgM construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100-especificidade) nas diluições 1:2.000, 1:8.000 e 1:32.000. Os resultados representam os valores dos índices avaliados e delimitam a área sob a curva (ASC). Os círculos coloridos dentro das curvas ROC, representam o melhor ponto de corte para pesquisa de AATF IgM. S=Sensibilidade; E=Especificidade e PC=Ponto de corte.

Posteriormente foram analisados os perfis de dispersão das amostras individuais nas diferentes diluições (Figura 8), onde pode-se observar que as três diluições apresentaram excelente desempenho na segregação entre os grupos de pacientes, quando considerados os diferentes pontos de corte obtidos pela curva ROC. A pesquisa de AATF IgM permitiu discriminar pacientes AG de indivíduos NI, com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. Portanto, inicialmente as três diluições mostraram-se candidatas ao diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda.

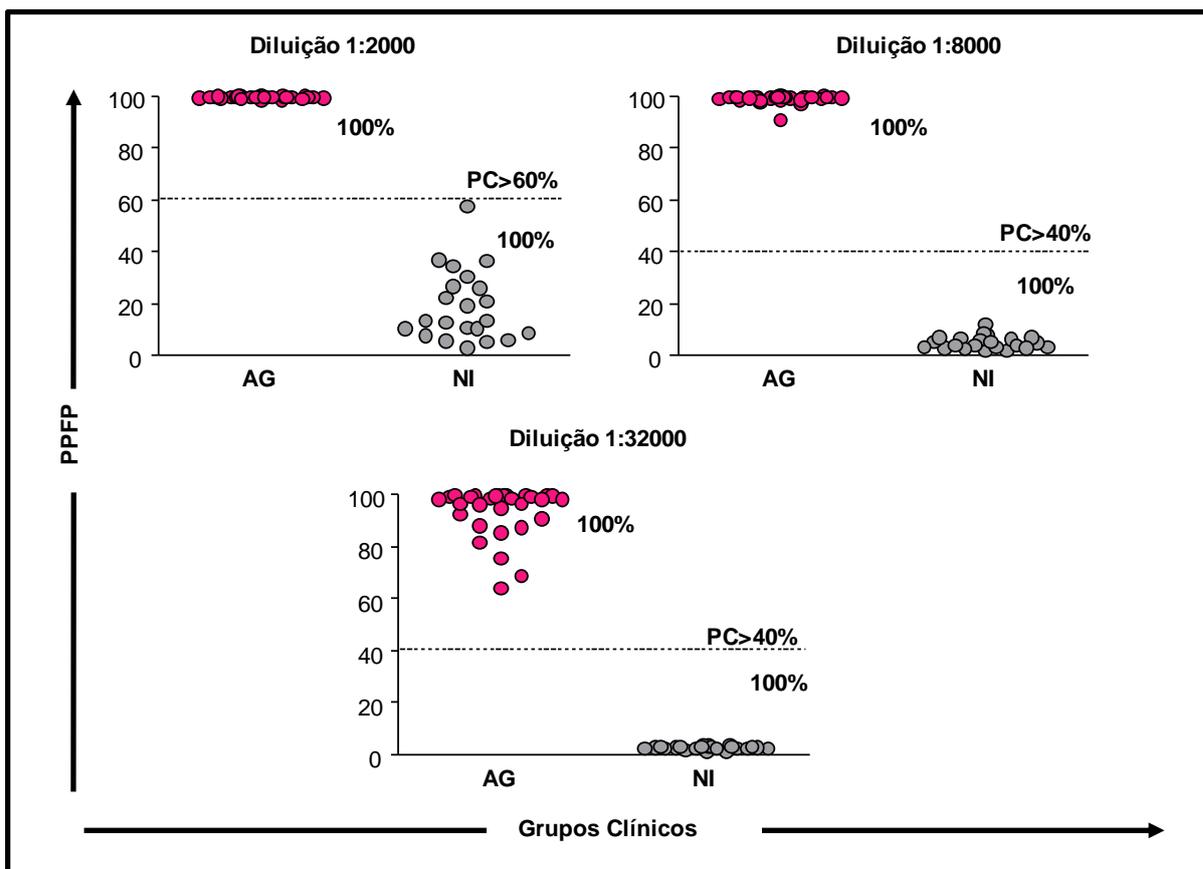


Figura 8 – Análise da reatividade individual de IgM nas três diluições do soro, selecionadas para os grupos AG (●) e NI (●). O resultado está expresso em valores de PPFP.

1.2 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica

A Figura 9 mostra os resultados da curva de reatividade de IgM anti-*T. gondii* de em soros individuais de pacientes AG (A) e CR (B) em valores de PPFP. Foi observado um perfil distinto da curva de titulação de IgM entre os grupos. Foram encontrados altos níveis de reatividade para os pacientes AG até a diluição 1:32.000 e níveis heterogêneos de reatividade foram observados para os pacientes CR.

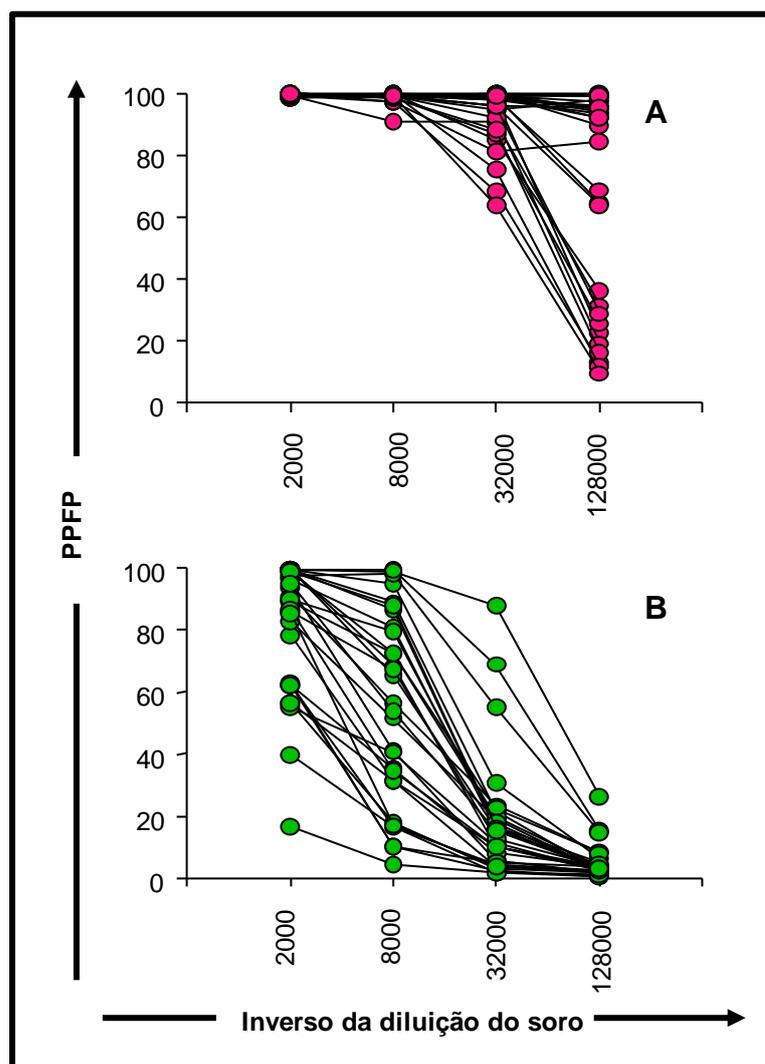


Figura 9 – Curva de reatividade de IgM anti-formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* presentes em soros (A) de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) toxoplasmose crônica CR (●). Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PPFP.

Através da análise da curva de reatividade média de PPFP (Figura 10) pode-se verificar que a diluição 1:32.000 apresentou maior amplitude de segregação (Δ PPFP) entre os grupos AG e CR, com Δ superior a 70%.

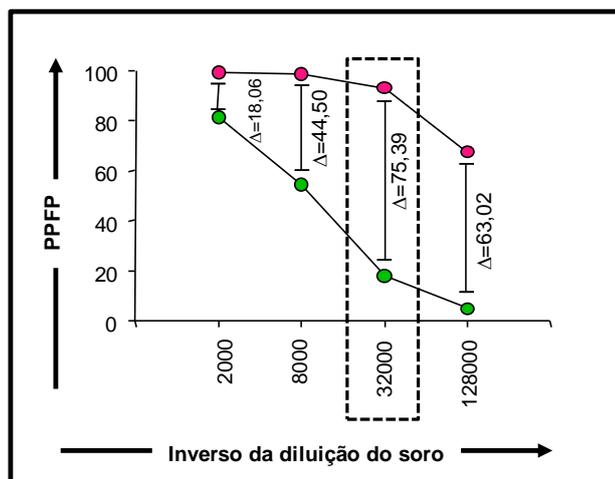


Figura 10 – Avaliação da amplitude (delta - Δ) de segregação entre as reatividades médias de IgM dos soros de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e toxoplasmose crônica CR (●) com os respectivos valores de Δ . A área delimitada equivale à diluição do soro cujo Δ foi superior a 70%.

Os valores de PFP das amostras individuais dos grupos AG e CR foram utilizados para construir a curva ROC e calcular os índices de desempenho da metodologia aplicada à exclusão da toxoplasmose crônica. Através da construção da curva ROC (Figura 11) pode-se verificar excelente índice de desempenho na diluição 1:32.000 apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 90%, e acurácia global ASC de 0,991 ($IC_{95\%}=0,97-1,00$), indicando uma elevada acurácia do método.

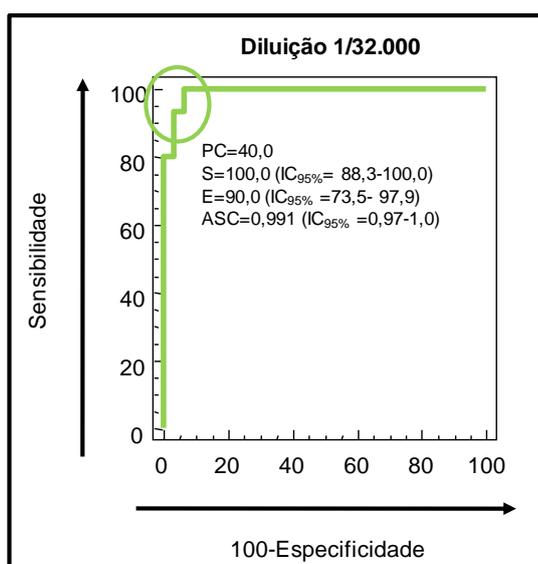


Figura 11 – Curva ROC da pesquisa de AATF IgM construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e 100-especificidade, na diluição 1:32.000. Os resultados representam os valores dos referidos índices avaliados e delimitam a área sob a curva (ASC). S=Sensibilidade; E=Especificidade e PC=Ponto de corte.

A Figura 12 mostra a reatividade de AATF IgM em soros individuais dos grupos AG, CR e NI na diluição 1:32.000. Empregando o ponto de corte de 40% de PFPF foi possível demonstrar que a pesquisa de anticorpos IgM anti-*T.gondii* permite diagnosticar 100% dos pacientes com toxoplasmose aguda e excluir 90% dos pacientes com toxoplasmose crônica e 100% dos indivíduos não-infectados.

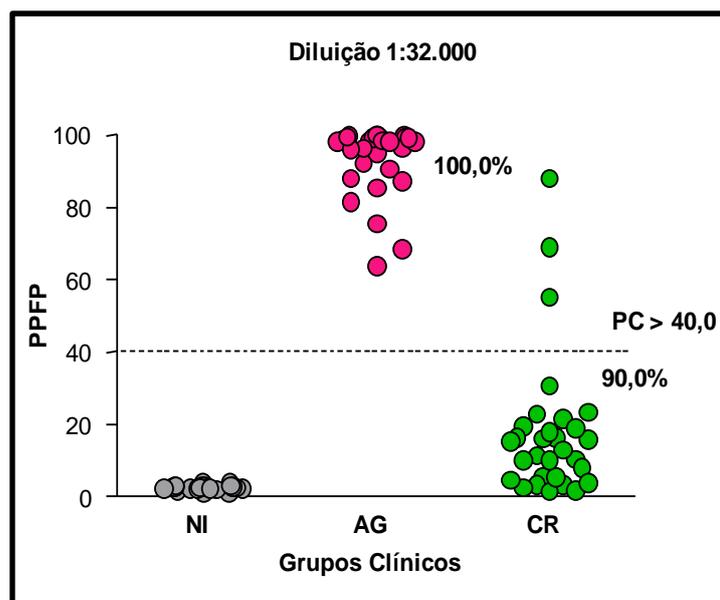


Figura 12 – Análise da reatividade individual de IgM na diluição soro selecionada nos grupos NI (●), AG (●) e CR (●). A linha pontilhada refere-se ao ponto de corte selecionado através da curva ROC. O resultado da reatividade de IgM para cada amostra individual está expresso em valores de PFPF.

Como a curva ROC não permite visualizar o valor numérico do ponto de corte, foi utilizada a ‘Two-Graph Roc Curve Analysis’ (TG-ROC), exemplificando uma nova análise gráfica que permite visualizar todos os pontos de corte com seus respectivos índices de sensibilidade e especificidade (Figura 13). A análise da curva TG-ROC demonstrou que na diluição do soro 1:32.000, o ponto de corte (PC) para segregação dos grupos AG e CR situava-se entre 20% e 60% mantendo 100% de sensibilidade e especificidade superior a 80%. Com base nesse achado, o ponto de corte escolhido foi 40% de PFPF com sensibilidade de 100% e especificidade 90%.

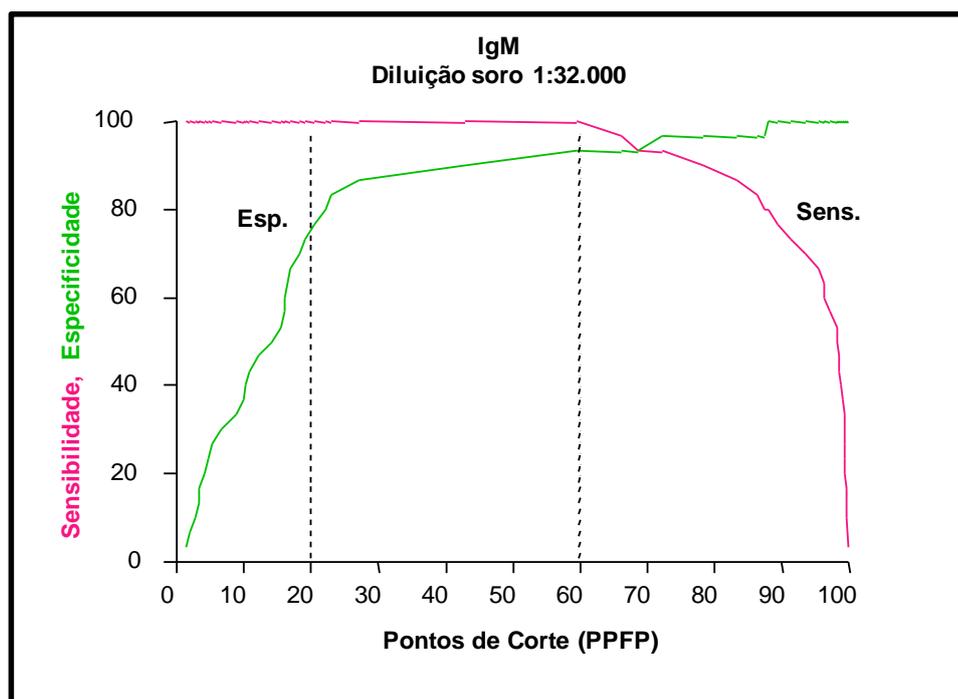


Figura 13 – Análise de TG-ROC na diluição do soro 1:32.000 e reatividade de AATF IgM em população constituída pelos grupos AG e CR para definição do ponto de corte. As linhas rosa e verde representam, respectivamente, os índices de Sensibilidade e Especificidade da metodologia.

Para complementação dos índices de desempenho do método, foram avaliadas as razões de verossimilhança (RVs) para as faixas de valores de PFP estabelecidas na pesquisa de AATF IgM (Tabela 3). A RV para o resultado positivo (PPFP>40%) foi >10 e negativo (PPFP≤40%) foi de 0,0. Isso significa que o valor de PPFP>40% tem 10 vezes mais chances em ser encontrado em um paciente com toxoplasmose aguda. Por outro lado, valores iguais ou inferiores a 40% de PFP apresentam uma chance nula (0,0) de advir de um paciente com toxoplasmose aguda. A análise das RVs confirmou o elevado desempenho do método avaliado através de indicadores expressos em chance, sendo que PPFP>40% contribuem para a confirmação da doença aguda e valores de PPFP≤40% excluem essa possibilidade.

Tabela 3: Razões de verossimilhança (RVs) da pesquisa de AATF IgM na diluição do soro 1:32.000 e ponto de corte 40% (PPFP)

AATF IgM	RVs
PPFP >40%	>10*
PPFP ≤40%	0,0**

*RV que contribui para confirmação de toxoplasmose aguda.

**RV que, praticamente, exclui a presença de toxoplasmose aguda.

1.3. Avaliação da aplicabilidade da pesquisa de AATF IgM na segregação sorológica de pacientes com toxoplasmose aguda e pacientes portadores de outras condições clínicas

Devido ao fato da presença do anticorpo IgM ter sido utilizada como critério inicial para o diagnóstico da toxoplasmose aguda, avaliou-se, então, a presença de outras doenças que pudessem levar à ocorrência de resultados falso-positivos devido à reatividade cruzada com esse anticorpo. Para cumprir tal objetivo, foram utilizadas amostras de soros de pacientes portadores de toxoplasmose aguda (AG, n=30) e de pacientes portadores das seguintes condições clínicas: Doenças de Chagas (CH, n=10), Malária (MAL, n=10), Leishmaniose Visceral (LV, n=5), Tuberculose (TB, n=10), Citomegalovírus (CMV, n=3), Epstein Barr (EBV, n=3), Herpes simples (HSV, n=2), Rubéola (RUB=3) e Fator anti-nuclear (FAN, n=5).

Conforme descrito anteriormente, o ponto de corte escolhido para pesquisa de AATF IgM foi de 40%, na diluição do soro 1:32.000. Sendo assim, os resultados foram classificados como positivos quando PFPF>40% e negativos quando PFPF ≤40%.

Os resultados da pesquisa de AATF IgM aplicada aos pacientes portadores de toxoplasmose (casos) e indivíduos não-portadores de toxoplasmose (não-casos), porém com outras doenças, foram classificados em quatro categorias: verdadeiro-positivo (VPos), falso-positivo (FPos), verdadeiro-negativo (VNeg) e falso-negativo (FNeg), como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4: Categorias de resultados da pesquisa de AATF IgM anti-(VPos, FPos, FNeg e VNeg) para pacientes AG e indivíduos portadores de outras doenças.

Resultado do Teste		Grupos		Total
		AG	Outras Doenças	
AATF IgM	Positivo (>40%PFPF)	VPos = 30	FPos = 2	32
	Negativo (≤40%PFPF)	FNeg = 0	VNeg = 46	46
Total		30	48	78

A Figura 14 mostra o perfil da reatividade de IgM anti-*T. gondii* em amostras individuais de soros de indivíduos NI, pacientes AG e pacientes CH, TB, MAL, CMV, EBV, RUB, HSV, LV e FAN, na diluição do soro 1:32.000, em função do ponto de corte de 40% de PFP. A análise dos resultados demonstrou que a técnica permite identificar 100% (30/30) dos indivíduos do grupo AG como positivos, com valores de PFP distribuídos em uma região de alta reatividade e 95,8% (46/48) dos pacientes portadores de outras doenças, como negativos, com valores de PFP distribuídos em uma região de baixa reatividade. Entretanto, dois soros de pacientes, um do grupo MAL e outro do grupo CMV apresentaram reatividade acima do ponto de corte.

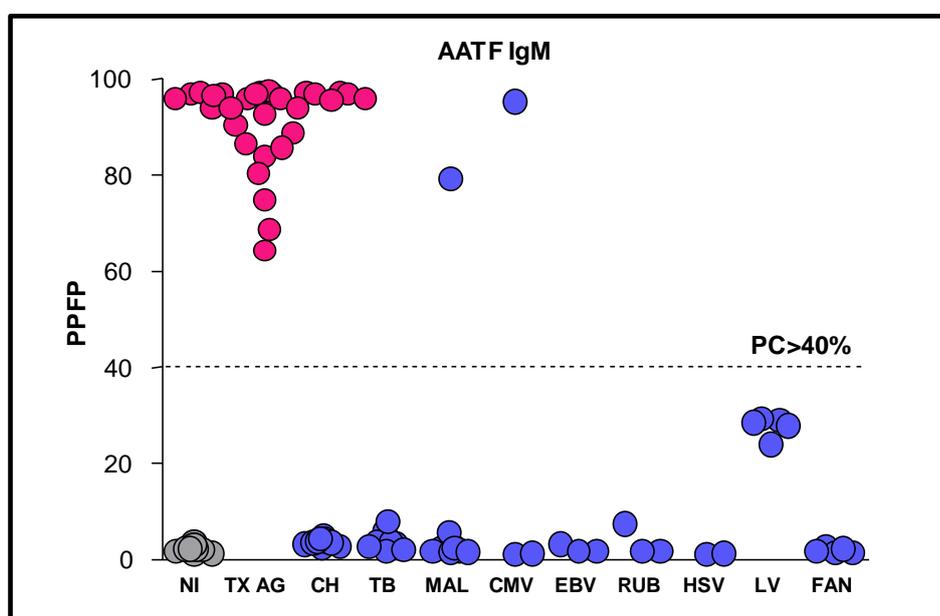


Figura 14 – Análise da reatividade de IgM anti-*T. gondii* em amostras individuais de pacientes portadores de toxoplasmose AG, CH, TB, MAL, CMV, EBV, RUB, HSV, LV, FAN e indivíduos NI, na diluição do soro 1:32.000. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFP empregando-se, como ponto de corte, um valor de 40% (linha pontilhada).

A Tabela 5 resume as informações referentes aos índices de desempenho da pesquisa AATF IgM por citometria de fluxo na segregação sorológica entre pacientes AG e pacientes com outras doenças com seus respectivos intervalos de confiança de 95%. A pesquisa de anticorpos IgM anti-*T. gondii* empregada no diagnóstico da toxoplasmose demonstrou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 96%. A análise dos resultados mostra uma perda na especificidade, atribuída a resultados falso-positivos apresentados por soros dos grupos MAL e CMV.

Ainda de acordo com a Tabela 5, a razão de verossimilhança (RV) para o resultado positivo da pesquisa de AATF IgM (PPFP>40%) foi superior a 10 e para o resultado negativo (PPFP≤40%) foi de 0,0. Esse dado significa que valores de PPFP>40% são dez vezes mais prováveis de serem encontrados em pacientes portadores de toxoplasmose aguda do que em pacientes portadores de outras condições clínicas. Por outro lado, valores de PPFP iguais ou inferiores a 40% apresentam chance praticamente nula (0,0 vezes) de advir de um paciente portador de toxoplasmose aguda.

Tabela 5: Índices de desempenho da pesquisa de AATF IgM, na diluição do soro 1:32.000 e ponto de corte 40%, de pacientes AG e pacientes com outras condições clínicas.

Índices de Desempenho	Toxo AG x Outras Doenças
	Diluição do soro 1:32.000 e PC 40% de PPFP
Sensibilidade	100,0
Especificidade	96,0
Acurácia	0,992
Razão de Verossimilhança (RV)	
PPFP >40%	>10*
PPFP ≤40%	0,0**

*RV que contribui para confirmação de toxoplasmose aguda.

**RV que praticamente exclui a presença de toxoplasmose aguda.

2 Estabelecimento dos critérios de interpretação da pesquisa de AATF IgG aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica

2.1 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana

Foram executados ensaios de reatividade de anticorpos IgG anti- formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* em soros individuais de pacientes do grupo AG e indivíduos do grupo NI. Os soros foram incubados nas diluições 1:32.000, 1:128.000, 1:512.000 e 1:2.048.000 com taquizoítas fixados. A revelação da ligação de anticorpos IgG a determinantes antigênicos do parasito foi realizada pela utilização de anticorpos policlonais anti-Fc de IgG humano conjugados ao FITC, conforme descrito na metodologia (Tabela 1).

A Figura 15 mostra os resultados da análise da reatividade de AATF IgG expressos como PFP das amostras individuais dos pacientes AG (A) e dos indivíduos NI (B). Nota-se que os valores de PFP das curvas de titulação de IgG para os pacientes AG e indivíduos NI apresentam perfis bastantes distintos. Foram encontrados altos níveis de reatividade para a maioria dos pacientes AG nas duas primeiras diluições, e baixos níveis de reatividade foram observados para os pacientes NI em todas as diluições testadas.

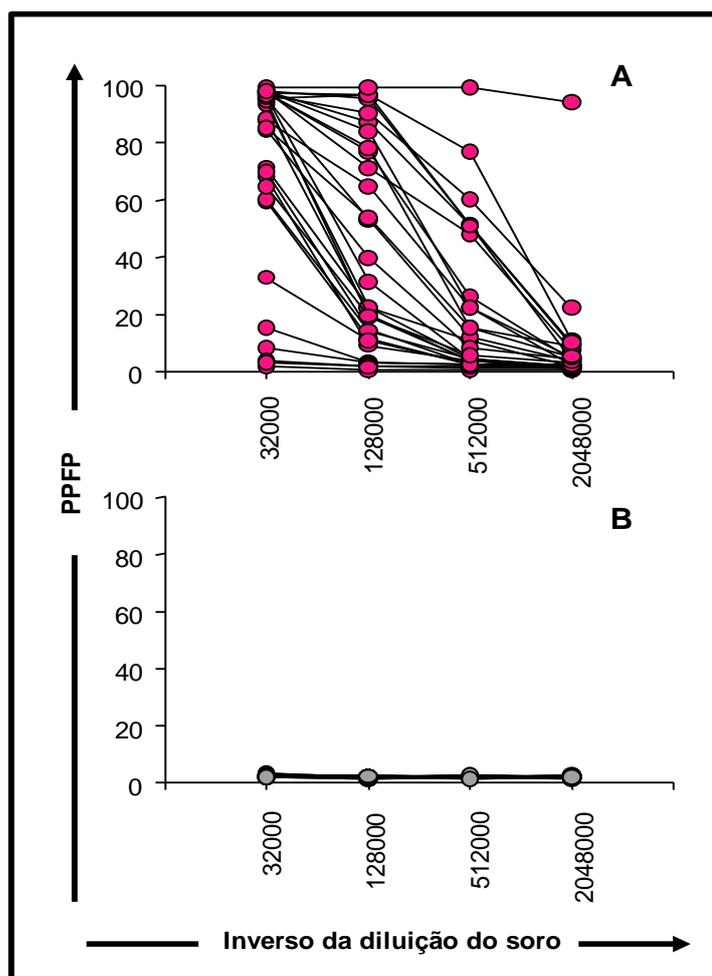


Figura 15 – Curva de reatividade de IgG anti- formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* presentes em soros (A) de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) de indivíduos não-infectados NI (●). Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PPFP.

Posteriormente foram obtidos os valores médios de PPFP para cada grupo testado nas diferentes diluições. O traçado da curva de reatividade média com os valores diferenciais entre a reatividade dos grupos (delta PPFP) permitiu avaliar a amplitude de segregação dos grupos avaliados. Pode-se observar pela Figura 16 que, apenas na diluição do soro 1:32.000, os grupos apresentaram boa segregação, com valor de Δ superior a 70%.

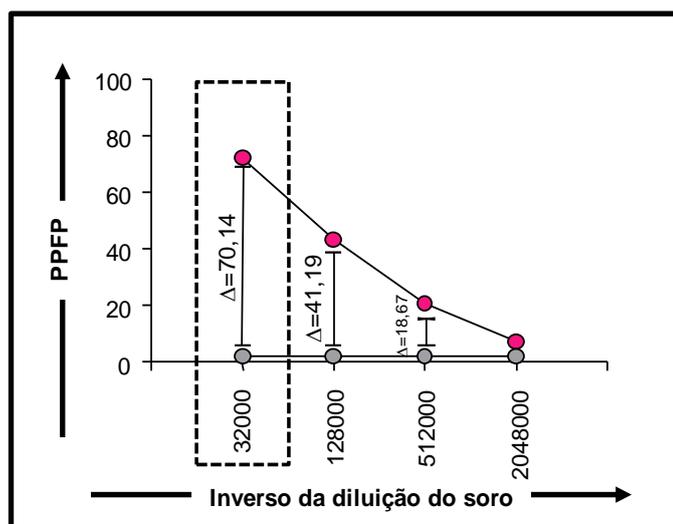


Figura 16 – Avaliação da amplitude (delta - Δ) de segregação entre as reatividades médias de IgG dos soros de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e de indivíduos não infectados NI (○), com os respectivos valores de Δ . A área delimitada equivale à diluição cujo Δ foi superior a 70%.

Após definir a diluição do soro que melhor segrega os grupos de pacientes com base nas curvas de titulação de IgG e diferença de reatividade (Δ), os valores individuais dos grupos de pacientes foram trabalhados na diluição 1:32.000 a fim de se construir a curva ROC e avaliar os índices de desempenho da nova metodologia aplicada ao diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda.

A curva ROC da pesquisa de AATF IgG aplicada aos pacientes AG e indivíduos NI está representada na Figura 17. A análise dos resultados da curva ROC mostrou um excelente desempenho da pesquisa de AATF IgG para a diluição 1:32.000, apresentando valores de 93,30% de sensibilidade ($IC_{95\%} = 77,9-99,2$) e 100% de especificidade ($IC_{95\%} = 84,4-100,0$) e acurácia global (ASC) de 0,98 ($IC_{95\%} = 0,95-1,02$)

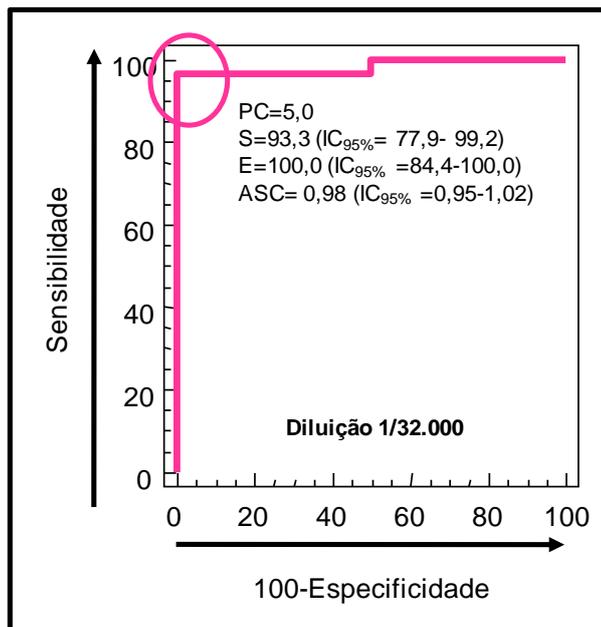


Figura 17 – Curva ROC da pesquisa de AATF IgG construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e 100-especificidade, na diluição 1:32.000. Os resultados representam os valores dos referidos índices avaliados e delimitam a área sob a curva (ASC). S=Sensibilidade; E=Especificidade e PC=Ponto de corte.

Uma vez determinado o ponto de corte a ser utilizado, foram analisados os perfis de dispersão das amostras individuais na diluição sérica 1:32.000 (Figura 18). Foi possível demonstrar que a pesquisa de AATF IgG permite discriminar pacientes AG de indivíduos NI, com 93,3% de sensibilidade e 100% de especificidade.

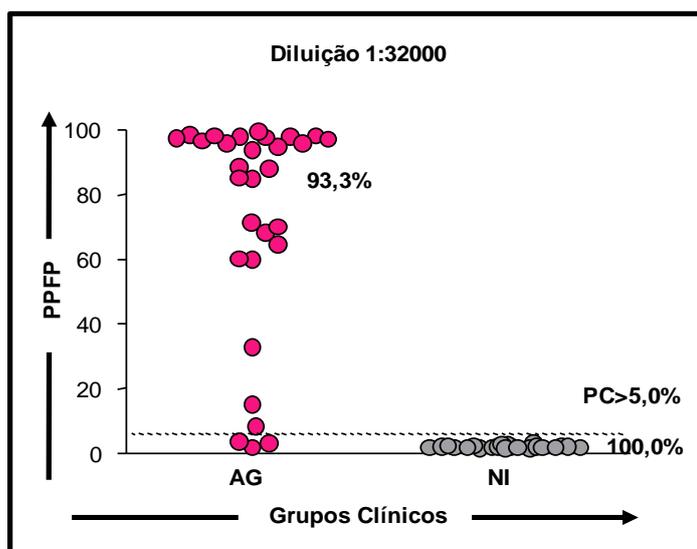


Figura 18 – Análise da reatividade individual de IgG anti-*T. gondii* na diluição do soro selecionada dos grupos AG (●) e NI (●). A linha pontilhada refere-se ao ponto de corte selecionado através da curva ROC. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP.

2.2 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica

A Figura 19 mostra os resultados da curva de reatividade de IgG em soros individuais de pacientes AG (A) e CR (B) em valores de PFP. Foi observado um perfil semelhante da curva de titulação de IgG entre os grupos. Altos níveis de reatividade foram encontrados, tanto para os pacientes AG, quanto para os pacientes CR.

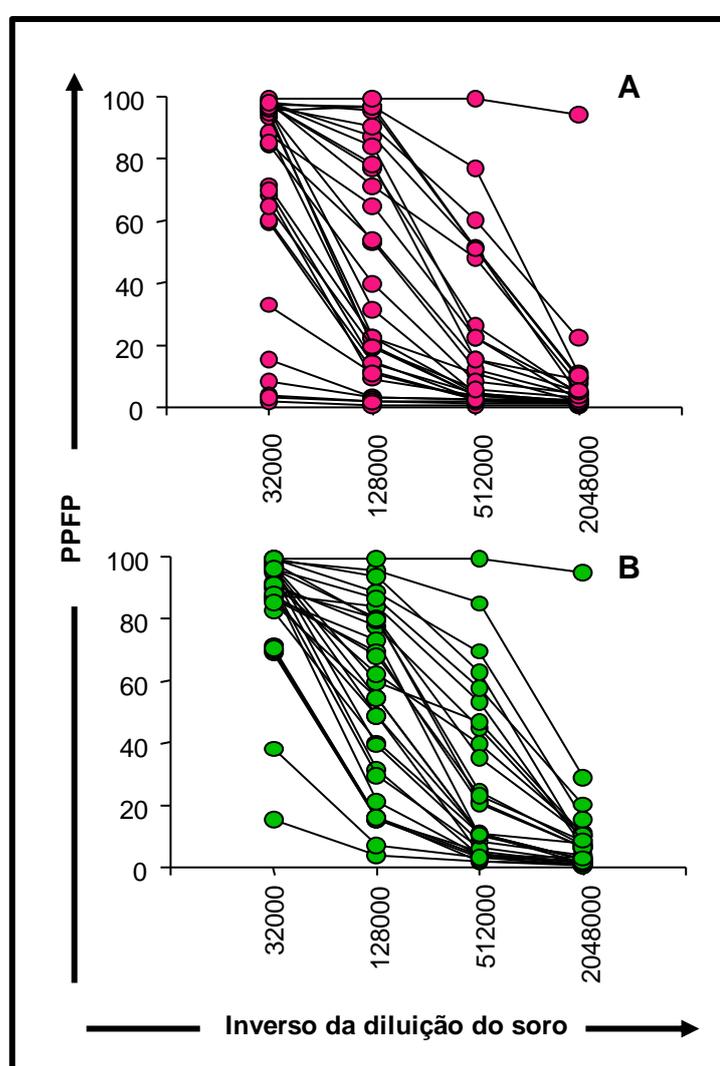


Figura 19 – Curva de reatividade de IgG anti-formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* presentes em soros (A) de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) toxoplasmose crônica CR (●). Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFP.

Através da análise da curva de reatividade média de PFP (Figura 20), pode-se verificar que não é possível segregar os pacientes AG dos pacientes CR.

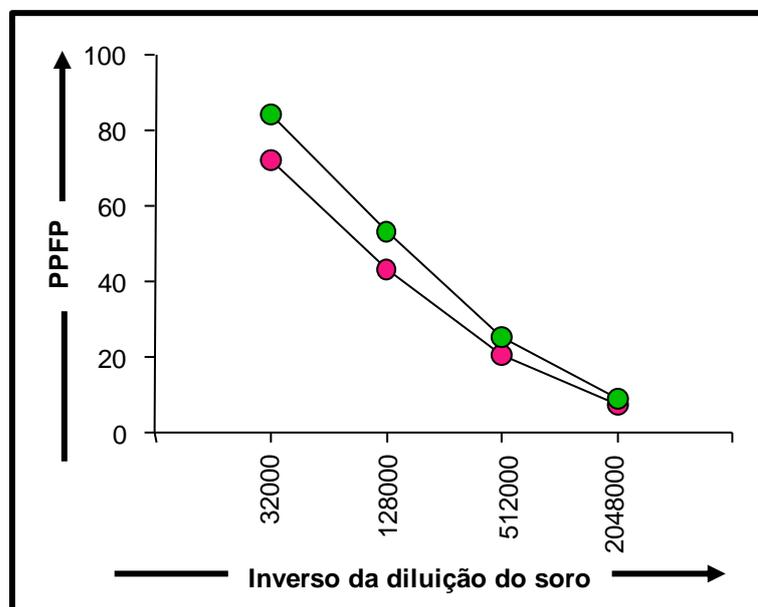


Figura 20 – Avaliação da amplitude de segregação entre as reatividades médias de IgG dos soros de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e toxoplasmose crônica CR (●).

Uma vez que a pesquisa de AATF IgG total não permitiu diferenciar pacientes agudos de crônicos, na próxima etapa do estudo avaliou-se a reatividade de subclasses de IgG na tentativa de buscar um novo marcador que pudesse diagnosticar os pacientes AG e excluir pacientes CR.

3. Estabelecimento dos critérios de interpretação da pesquisa de AATF subclasses de IgG aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica

3.1 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana

Empregando a pesquisa de AATF subclasses de IgG foram executados ensaios de reatividade de anticorpos subclasses de IgG anti-formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* em soros individuais de pacientes do grupo AG e indivíduos do grupo NI. Os soros foram incubados nas diluições 1:32.000, 1:128.000, 1:512.000 e 1:2.048.000 para IgG1, 1:400, 1:1.600, 1:6.400 e 25.600 para IgG2 e IgG4 e 1:2.000, 1:8.000, 1:32.000 e 1:128.000 para IgG3 com taquizoítas fixados. A revelação da ligação de subclasses de IgG a determinantes antigênicos do parasito foi realizada pela utilização de anticorpos monoclonais anti- subclasses de IgG humano conjugados à biotina e posterior adição de SAPE diluído 1:400, conforme descrito na metodologia.

A Figura 21 mostra os resultados da análise da reatividade de AATF subclasses de IgG expressos como PFP em amostras individuais dos pacientes AG coluna (A) e dos indivíduos NI coluna (B). Observou-se que os valores de PFP das curvas de titulação de subclasses de IgG para os pacientes AG e indivíduos NI apresentaram claramente perfis distintos. Foram encontrados altos níveis de reatividade para a maioria dos pacientes AG nas diluições do soro 1:32.000, 1:400, 1:2.000 e 1:400, para IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, respectivamente, e baixa reatividade para NI em todas as diluições testadas.

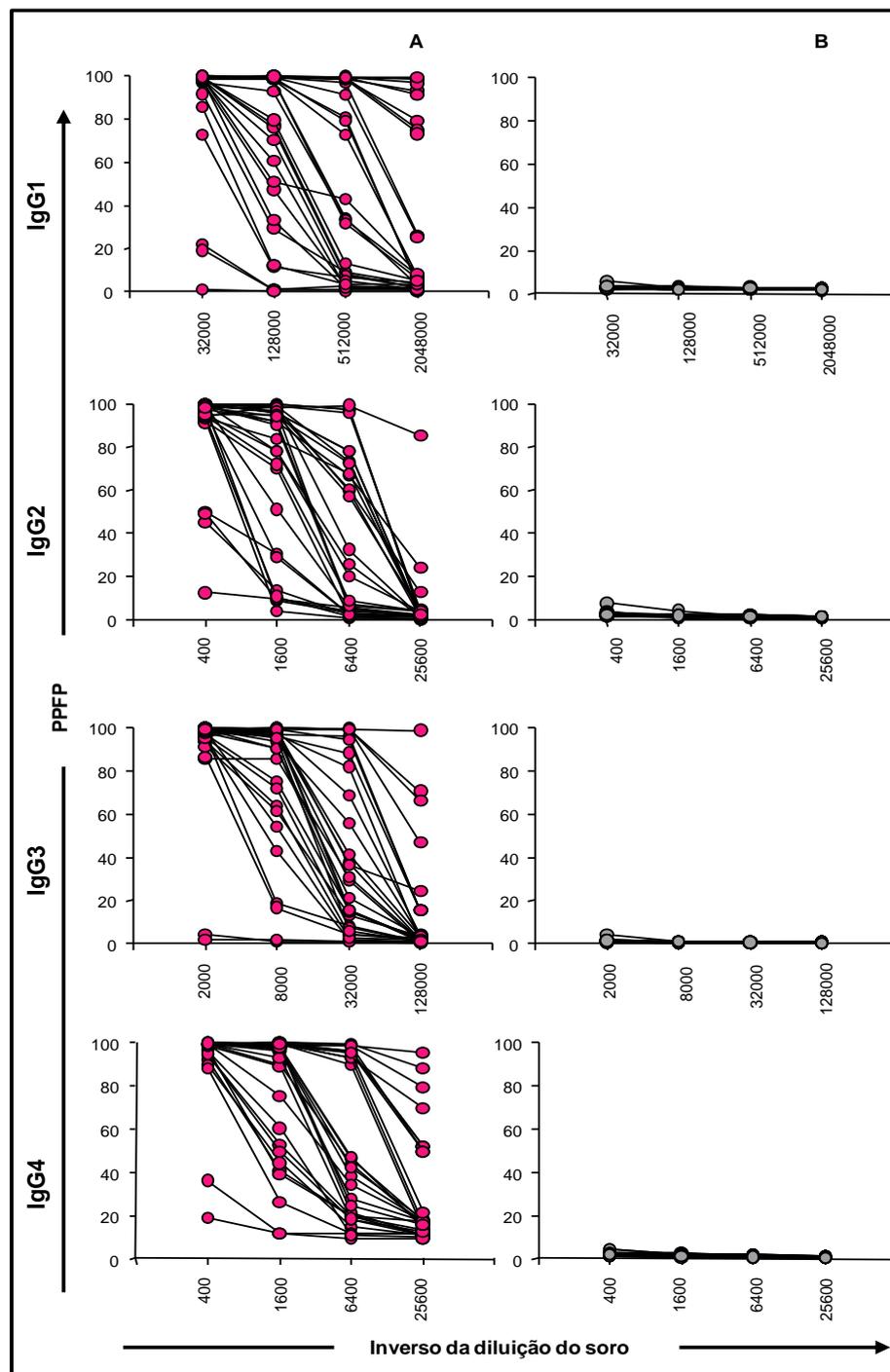


Figura 21 – Curva de reatividade de subclasses de IgG anti- formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* presentes em soros (A) de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) de indivíduos não-infectados NI (●). Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFPF.

Posteriormente foram obtidos valores de PFPF para cada grupo testado nas diferentes diluições que permitiram o traçado da curva de reatividade média com os valores diferenciais entre a reatividade dos grupos (delta PFPF) para avaliar a

amplitude de segregação entre os grupos. Pode-se observar pela Figura 22 que, para o anticorpo IgG1, a diluição do soro em que os grupos apresentaram excelente segregação, com valor de Δ superior a 70%, foi 1:32.000; para IgG2 correspondeu à diluição 1:400 e para as subclasses IgG3 e IgG4 foram encontradas duas diluições, 1:2.000/1:8.000 e 1:400/1:1.600, respectivamente.

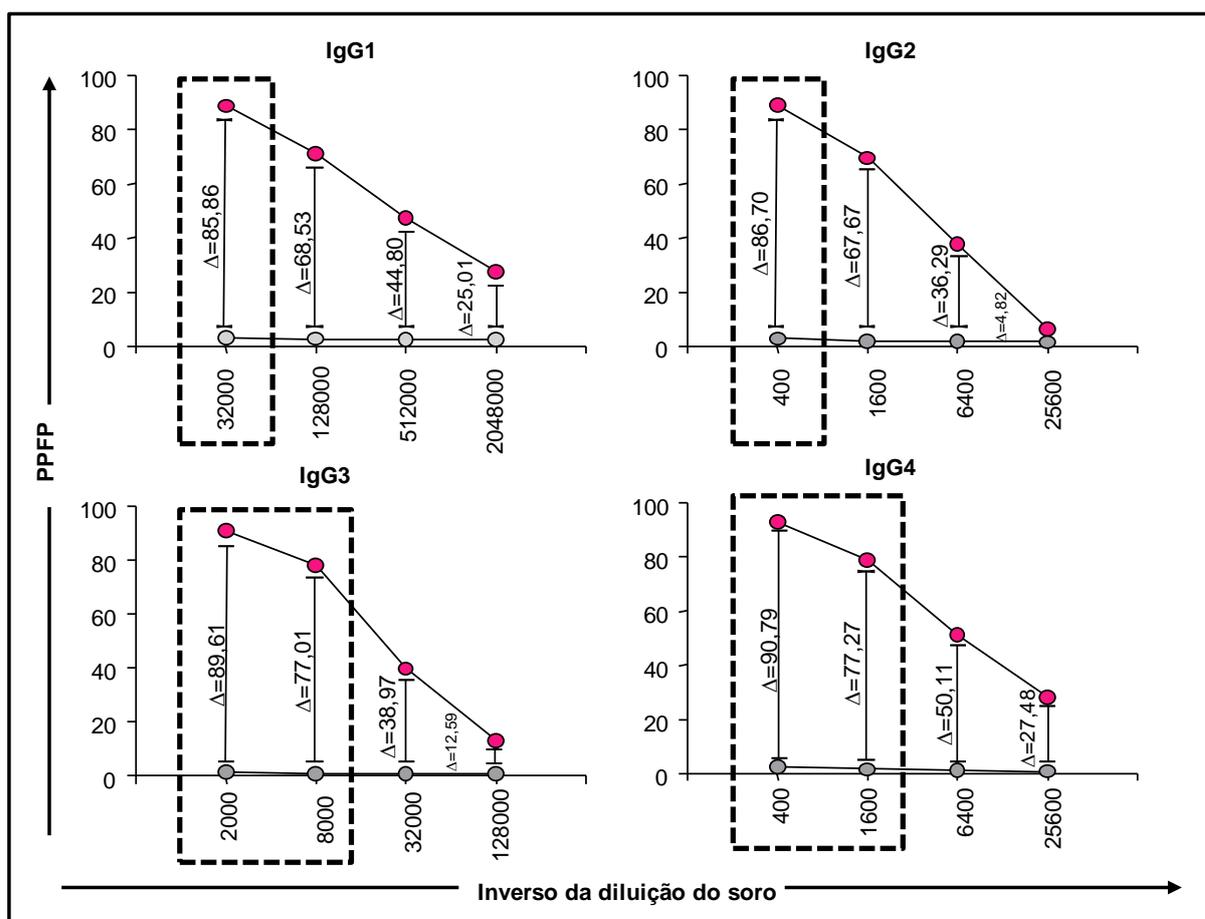


Figura 22 – Avaliação da amplitude (delta - Δ) de segregação entre as reatividades médias de subclasses de IgG dos soros de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e de indivíduos não infectados NI (○), com os respectivos valores de Δ . A área delimitada equivale às diluições dos soros cujos Δ foram superiores a 70%.

Após definir as diluições que melhor segregam os grupos de pacientes com base nas curvas de titulação de subclasses de IgG e diferença de reatividade (Δ), os valores individuais dos grupos de pacientes foram trabalhados nas diluições testadas a fim de se construir a curva ROC e avaliar os índices de desempenho da nova metodologia aplicada ao diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda

A curva ROC da pesquisa de AATF subclasses de IgG aplicada aos pacientes AG e indivíduos NI está representada na Figura 23. A análise dos resultados da curva ROC mostrou um excelente desempenho da pesquisa de AATF subclasses de IgG para as diluições testadas de todas as subclasses.

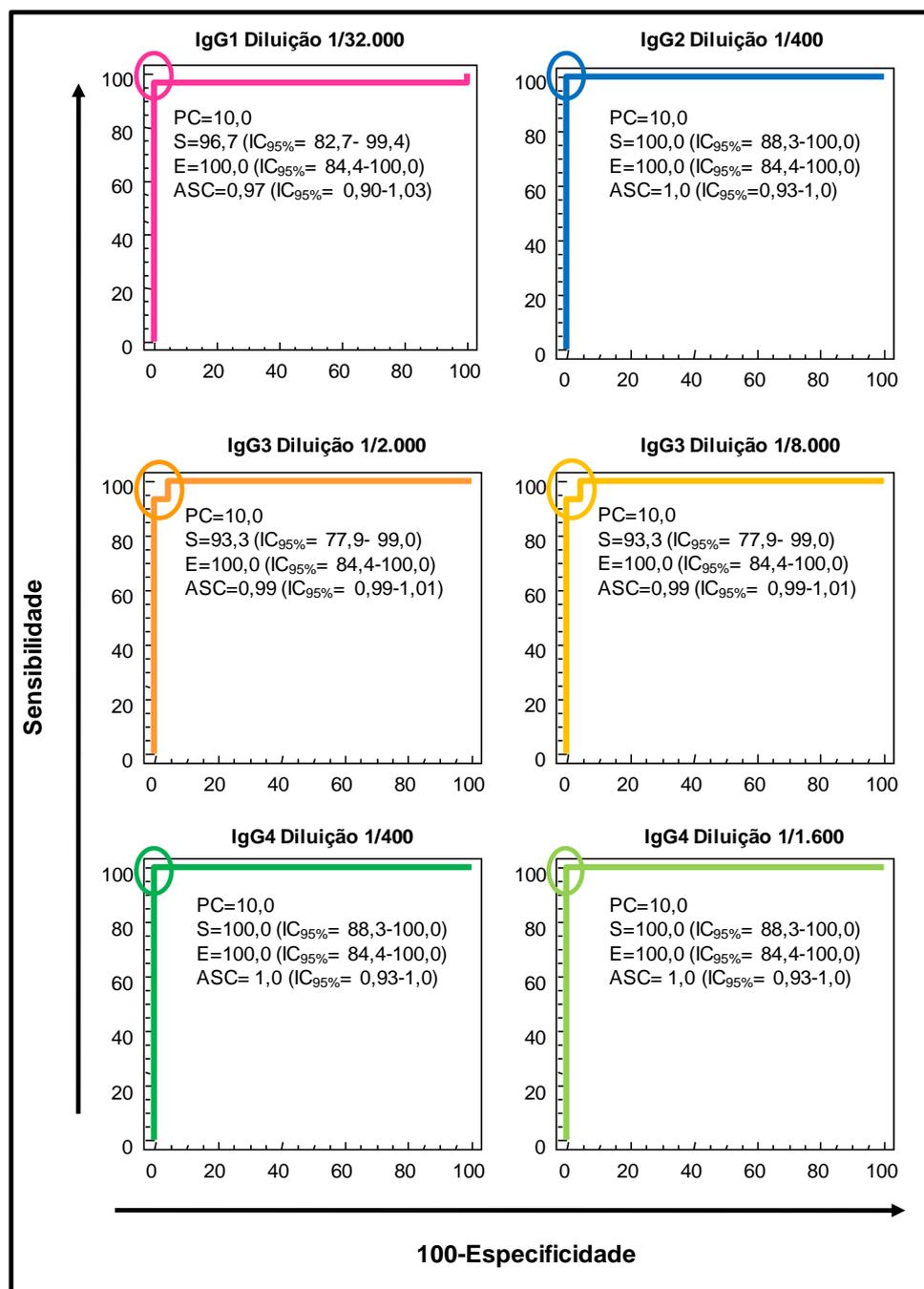


Figura 23 – Curvas ROC da pesquisa de AATF subclasses de IgG construídas a partir dos índices de desempenho. Os resultados representam os valores dos referidos índices avaliados e delimitam a área sob a curva (ASC). O círculo dentro da curva representa o melhor ponto de corte sugerido pela curva para a pesquisa de AATF subclasses de IgG. S=Sensibilidade; E=Especificidade e PC=Ponto de corte.

A Tabela 6 resume as informações referentes aos índices de desempenho da pesquisa de subclasses de IgG anti-*T. gondii* com seus respectivos intervalos de confiança a 95% utilizando, como controle, soros de indivíduos não-infectados.

Tabela 6: Índices de desempenho da pesquisa de AATF subclasses de IgG

Subclasse	Diluição	PC (%)	Sens(%)	IC 95%	Esp(%)	IC 95%	ASC	IC95%
IgG1	1:32.000	10	96,7	82,7-99,4	100	84,4-100	0,97	0,90-1,03
IgG2	1:400	10	100	88,3-100	100	84,4-100	1,0	0,93-1,00
IgG3	1:2.000	10	93,3	77,9-99,0	100	84,4-100	0,99	0,99-1,01
IgG3	1:8.000	10	93,3	77,9-99,0	100	84,4-100	0,99	0,99-1,01
IgG4	1:400	10	100	88,3-100	100	84,4-100	1,0	0,93-1,00
IgG4	1:1.600	10	100	88,3-100	100	84,4-100	1,0	0,93-1,00

Adicionalmente foram analisados os perfis de dispersão das amostras individuais (Figura 24), onde pode-se observar que as diluições avaliadas apresentaram excelente desempenho na segregação entre os grupos de pacientes pela análise da curva ROC. A pesquisa das subclasses IgG2 e IgG4 apresentou 100% de sensibilidade e especificidade e, conforme a classificação sugerida por Swets (1988), o valor de ASC de 1,00, indica um teste perfeito.

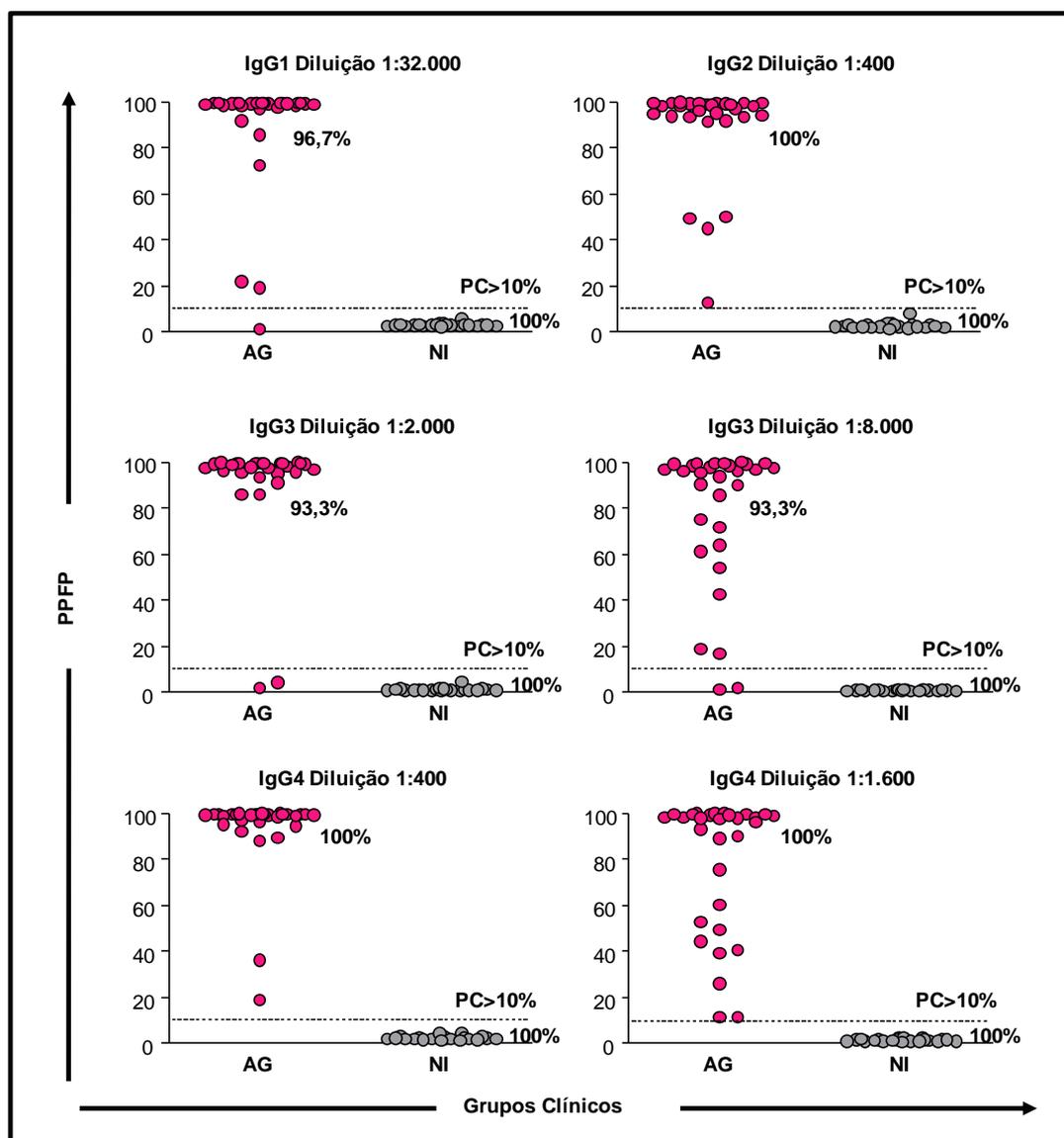


Figura 24 – Análise da reatividade de subclasses de IgG anti-*T. gondii* nas diluições de soro selecionadas para os grupos AG (●) e NI (○) através do perfil de dispersão individual das amostras. O resultado da reatividade de subclasses de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP.

3.2 Determinação da diluição do soro aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica

A Figura 25 mostra os resultados da curva de reatividade de soros individuais de pacientes AG (A) e CR (B) em valores de PFP. Foi observado um perfil semelhante da curva de titulação de IgG entre os grupos. Altos níveis de reatividade foram encontrados tanto para os pacientes AG quanto para os pacientes CR, independente da subclasse avaliada.

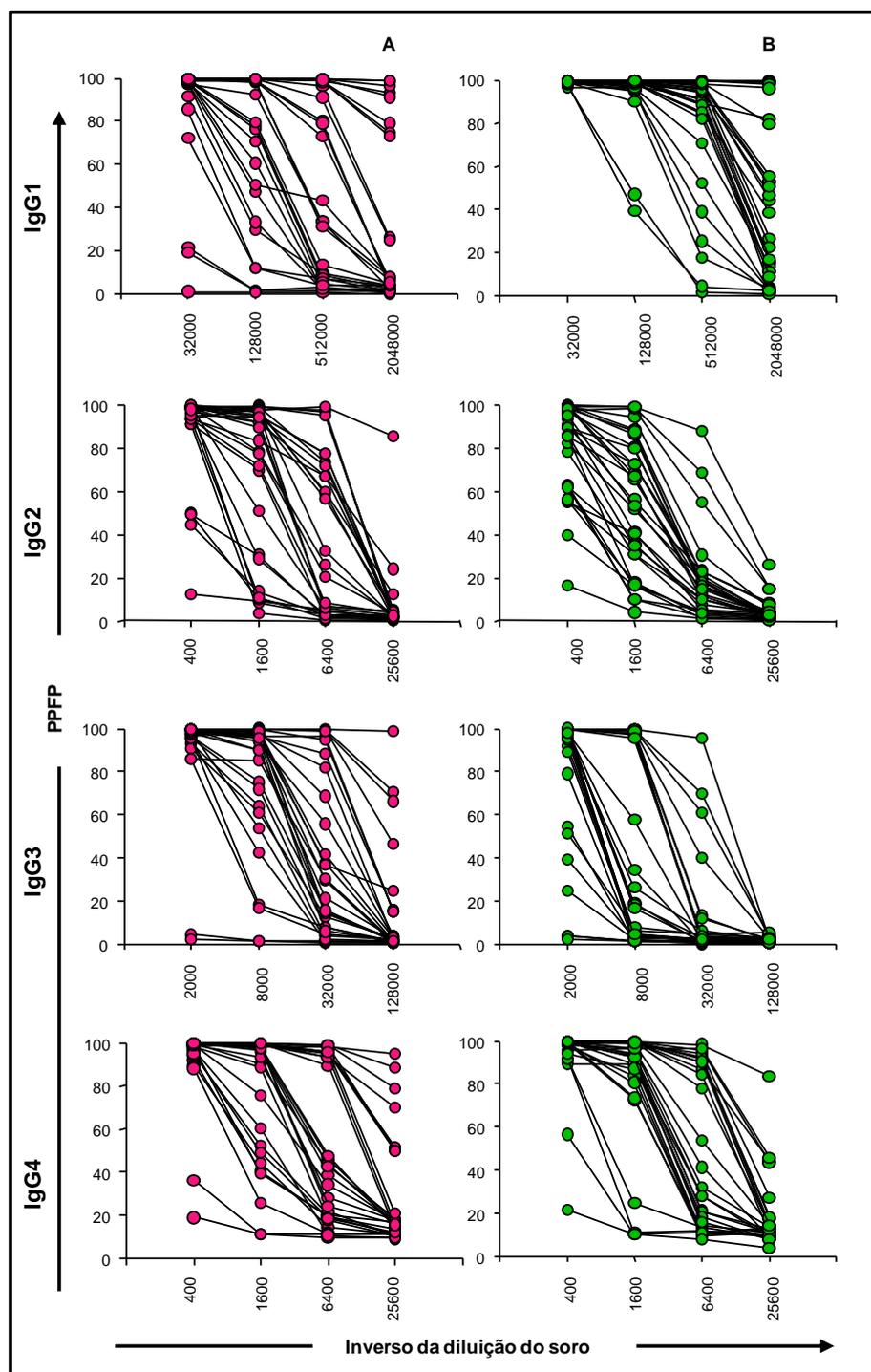


Figura 25 – Curva de reatividade de subclasses de IgG anti- formas taquizoítas fixadas de *T. gondii* presentes em (A) soros de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e (B) toxoplasmose crônica CR (●). Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PPFP.

Através da análise da curva de reatividade média de PFP (Figura 26), pode-se verificar que não é possível segregar os pacientes AG dos pacientes CR utilizando a pesquisa de AATF subclasses de IgG.

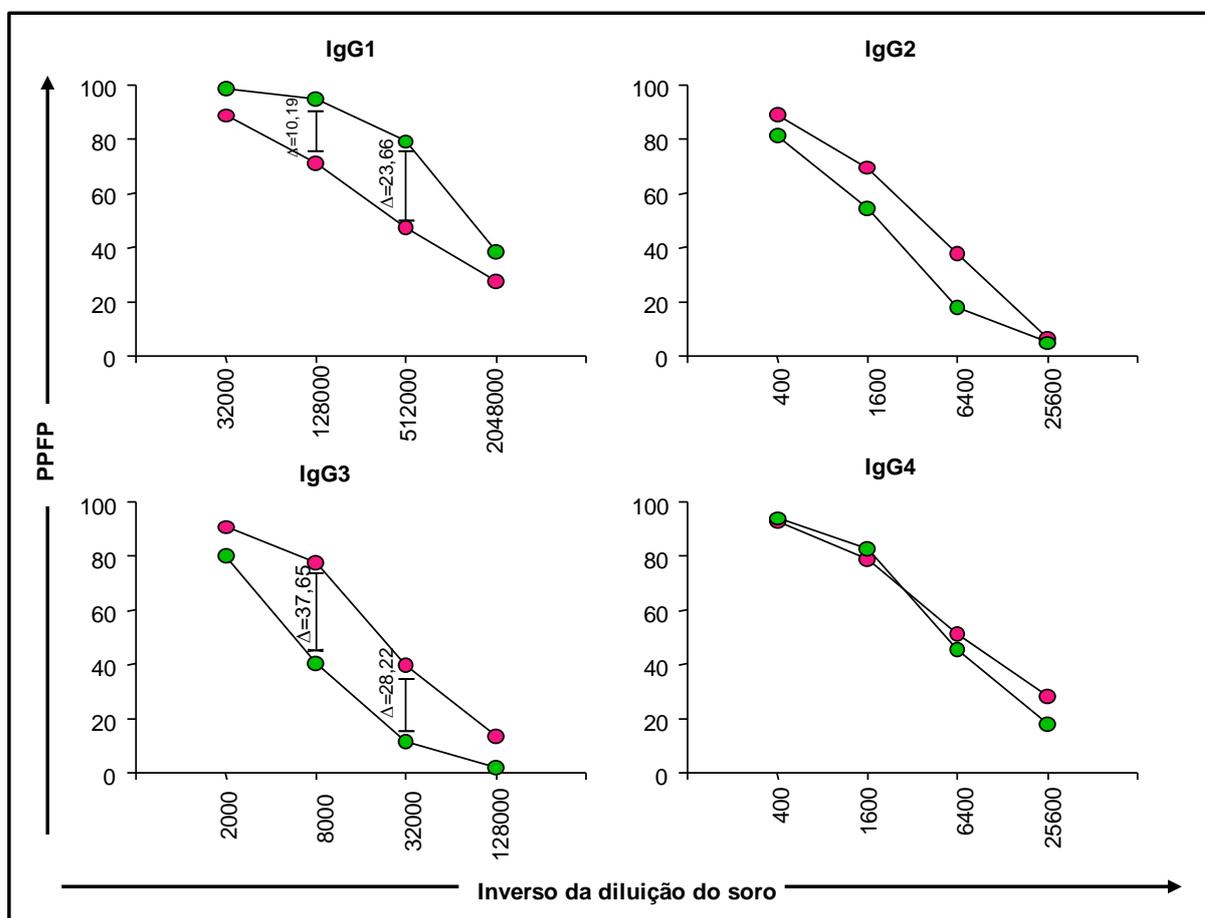


Figura 26 – Avaliação da amplitude de segregação entre as reatividades médias de subclasses de IgG anti-*T. gondii* dos soros de pacientes com toxoplasmose aguda AG (●) e toxoplasmose crônica CR (●).

4. Estabelecimento dos critérios de interpretação da pesquisa de avidéz de anticorpos IgG aplicada ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica

Os resultados da pesquisa de AATF IgG demonstraram alta reatividade de IgG tanto em pacientes agudos quanto em pacientes crônicos, impedindo a diferenciação entre os grupos. Entretanto, conhecendo as características de maturação da resposta imune humoral de *T. gondii* que resultam no reconhecimento diferencial de seus antígenos por anticorpos IgG de baixa e alta avidéz, presentes em soros de pacientes portadores da forma aguda e crônica da infecção respectivamente, avaliou-se a utilização da citometria de fluxo na determinação do índice de avidéz desses anticorpos.

Para avaliar o índice de avidéz (IA) de IgG foram utilizadas quatro diluições do soro: 1:32.000, 1:128.000, 1:512.000 e 1:2.048.000 tratados, ou não, com uréia. Para o cálculo do índice de avidéz foi utilizado à última diluição do soro que apresentava valores de PFP superiores a 30% no teste não tratado com uréia, uma vez que os resultados de índice de avidéz obtidos com valores de PFP<30% foram inconsistentes.

A figura 27 representa a curva de titulação de anticorpos IgG anti-*T. gondii* do ensaio de avidéz de IgG de 3 amostras de pacientes do grupos AG e 3 pacientes CR, escolhidos aleatoriamente, da placa lavada com PBS-3%SFB (linha contínua) e lavada com uréia 6M (linha pontilhada), a zona cinza refere-se aos valores de PFP<30%. A figura mostra que foram utilizadas diferentes diluições para o cálculo dos índices de avidéz, mas independente da diluição utilizada para os dois grupos, os resultados dos índices de avidéz foram compatíveis com infecção aguda ($IA \leq 60\%$), no grupo AG, e com infecção crônica ($IA > 60\%$) no grupo CR, considerando o ponto de corte definido pela curva ROC.

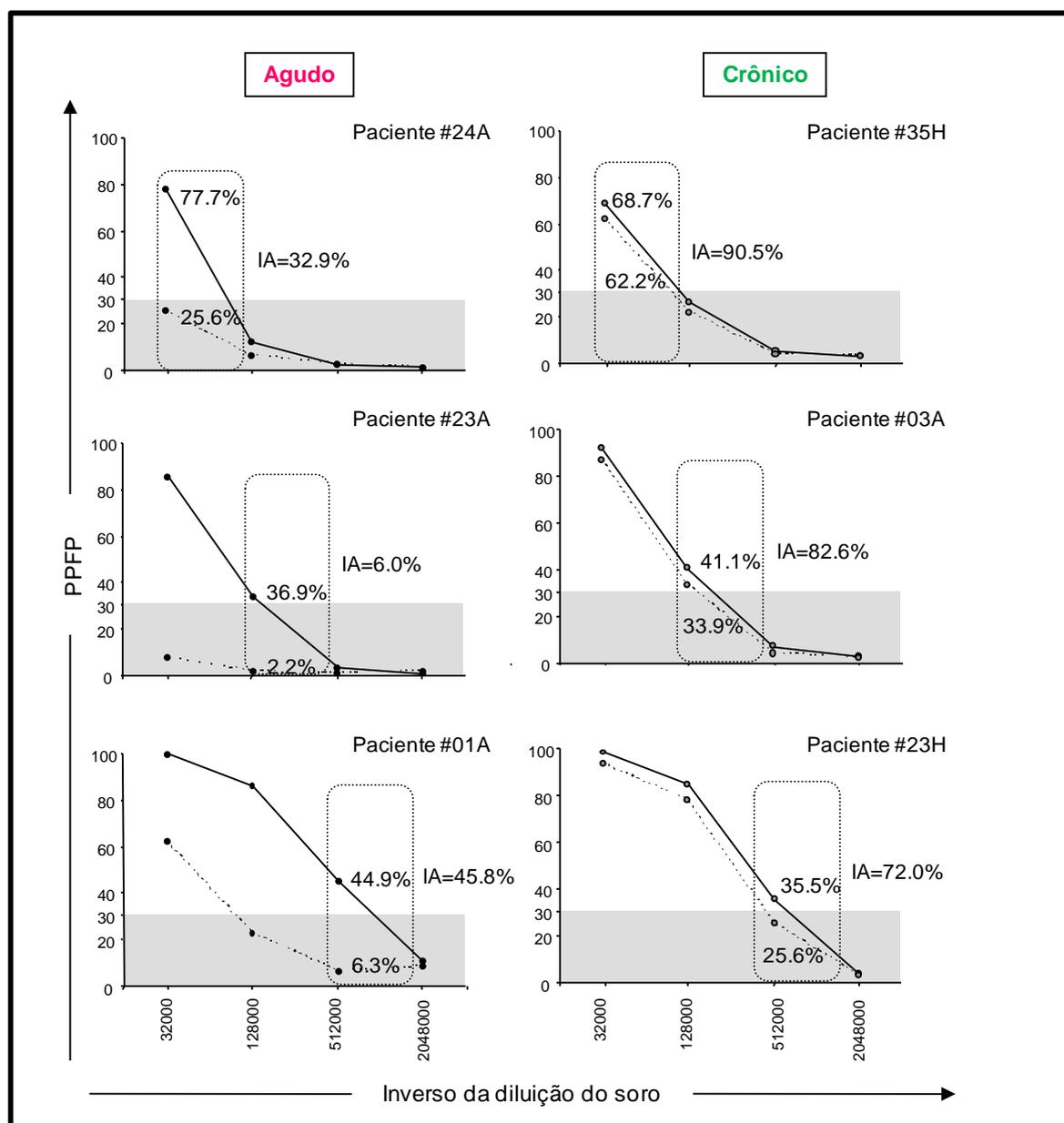


Figura 27 – Curva de titulação de anticorpos IgG anti-*T. gondii* do ensaio de avidéz de IgG de 3 amostras de pacientes do grupos AG e 3 pacientes CR, da placa lavada com PBS-3%SFB (U⁻:linha contínua) e lavada com uréia 6M (U⁺:linha pontilhada), a zona cinza refere-se aos valores de PPFP<30%. Os índices de avidéz foram calculados seguindo a fórmula: $IA = [PPFP(U^+) / PPFP(U^-)] \times 100$.

Os valores dos índices de avidéz obtidos nos ensaios foram analisados utilizando a curva ROC, representada na Figura 28. A análise dos resultados da curva ROC mostrou um excelente desempenho da pesquisa de avidéz empregando-se o ponto de corte de 60% de IA com sensibilidade e especificidade de 100% e acurácia global ASC de 1,0 ($IC_{95\%} = 0,93-1,00$).

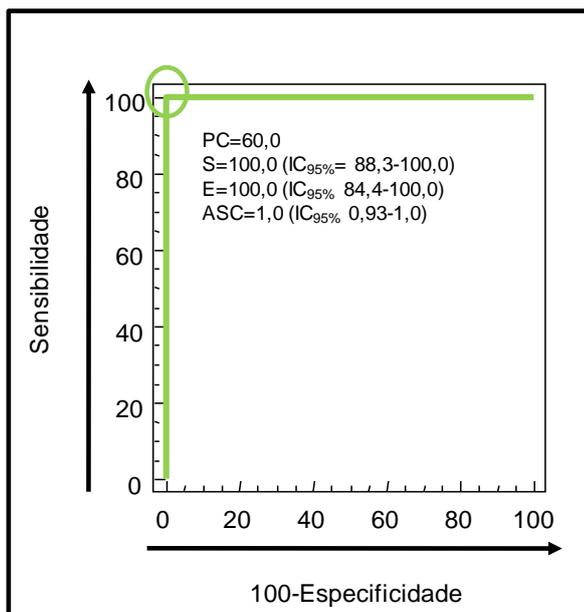


Figura 28 - Curva ROC da pesquisa da avidez de IgG construída a partir dos índices de desempenho. Os resultados representam os valores dos referidos índices avaliados e delimitam a área sob a curva (ASC). O círculo dentro da curva representa o melhor ponto de corte sugerido pela curva para a pesquisa de AATF subclasses de IgG. S=Sensibilidade; E=Especificidade e PC=Ponto de corte.

A análise dos perfis de dispersão dos índices de avidez para cada amostra individual, calculados conforme descrito acima, (Figura 29) demonstrou que todos os pacientes AG apresentaram índices de avidez de IgG menores que 60%, ao passo que todos os pacientes CR apresentaram índice de avidez superiores a 60%, inclusive os 3 pacientes do grupo CR que apresentaram IgM residual.

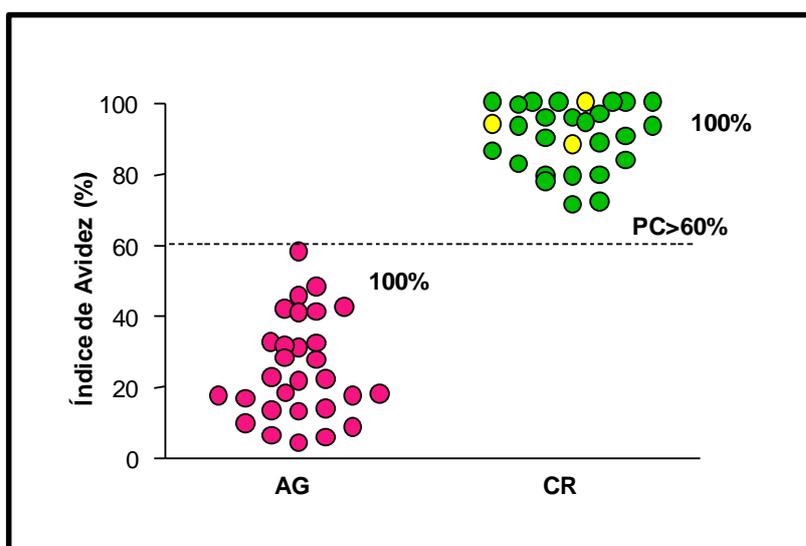


Figura 29 – Análise dos índices de avidez dos grupos AG (●) e CR (●) através do perfil de dispersão individual das amostras. Pacientes do grupo CR (●) que possuíam IgM residual e foram encontrados índice de avidéz alto (>60%) para pesquisa da avidéz de IgG.

Posteriormente foi realizada uma análise combinada dos resultados obtidos pelos ensaios de pesquisa de AATF IgM juntamente com o ensaio de avidez de IgG por citometria.

A figura 30 mostra que dos 30 pacientes avaliados do grupo AG, todos (100%) apresentaram valores de PFPF>40% para pesquisa de IgM (resultado positivo), e também apresentaram índice de avidez baixos ($\leq 60\%$), ao passo que, dos 30 pacientes do grupo CR, apenas 3 (10%) apresentaram valores de PFPF>40% para pesquisa de IgM (IgM residual), entretanto, para pesquisa de avidez de IgG todos pacientes do grupo CR apresentaram índice de avidez alto ($>60\%$). Dessa forma, os 3 pacientes do grupo CR que apresentaram resultados IgM residual, ou seja, com PFPF $>40\%$, foram classificados como crônicos nos ensaios de avidez.

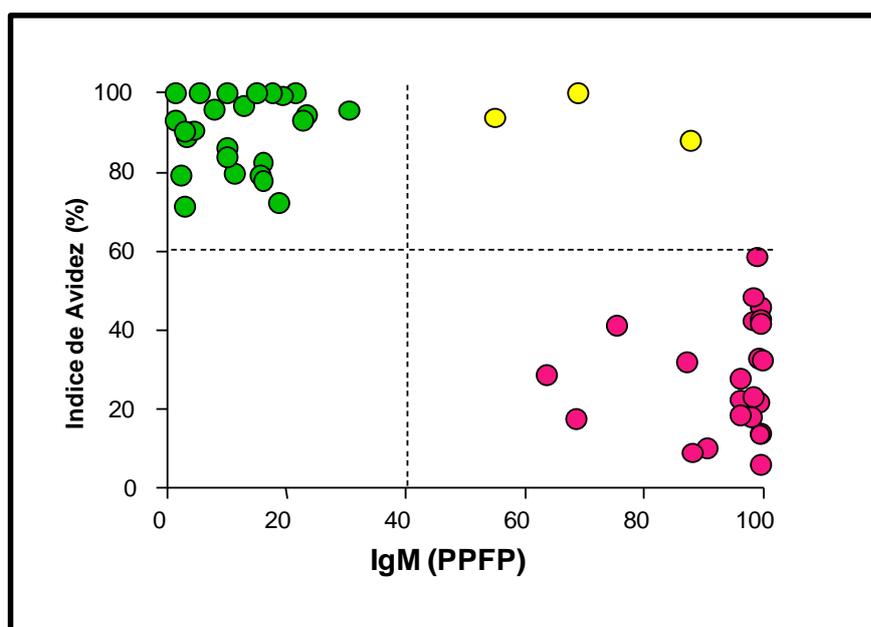


Figura 30 – Combinação dos resultados da pesquisa de AATF IgM e índice de avidez de IgG por citometria de fluxo em pacientes do AG (●) e CR (●). Resultados de IgM residual para pesquisa de AATF IgM (●) encontrados no grupo CR.

5. Análise comparativa do desempenho da citometria de fluxo e do sistema VIDAS® TOXO (ELFA – *Enzyme Linked Fluorescent Assay*) no diagnóstico da toxoplasmose aguda e exclusão da toxoplasmose crônica

Com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de uma nova abordagem sorológica não convencional, os resultados da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, aqui reportados foram comparados aos do teste sorológico imunoenzimático ELFA – *Enzyme Linked Fluorescent Assay*, que é um método automatizado, utilizado nos laboratórios clínicos.

Dessa forma, foram realizadas análises paralelas dos indicadores de desempenho das referidas metodologias, e calculados índices de desempenho expressos %.

A Figura 31 mostra os resultados da reatividade de IgM detectada por ELFA em soros de pacientes com toxoplasmose aguda (AG) e crônica (CR). A análise dos dados demonstrou que o ELFA foi capaz de identificar como positivas todas as amostras de pacientes AG, utilizando o ponto de corte preconizado pelo fabricante, qualificando o método com 100% de sensibilidade. Entretanto, quando aplicada na exclusão dos pacientes CR, o ELFA permitiu identificar apenas 3 amostras como negativas demonstrando, assim, uma especificidade de 14,3%.

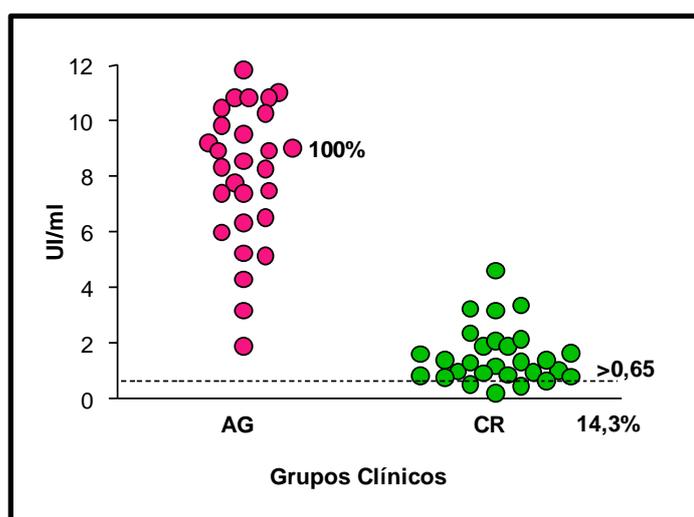


Figura 31 – Análise da reatividade de IgM anti-*T. gondii* por ELFA, em soros individuais de pacientes dos grupos AG (n= 28 ●) e CR (n= 28 ●). O resultado da reatividade de IgM para cada amostra individual está expresso em Unidades internacionais/ml (UI/ml), empregando o valor >0,65 (linha pontilhada) como ponto de corte, conforme descrito pelo fabricante. Os resultados mostram a sensibilidade de (100%), e especificidade de (14,3%) do ELFA aplicada em soros de pacientes dos grupos AG e CR.

Os índices de avidéz de IgG dos soros dos pacientes AG e CR obtidos através da metodologia ELFA estão representados na Figura 32. A análise dos dados demonstrou que todos os pacientes agudos apresentavam índice de avidéz baixo, utilizando o ponto de corte preconizado pelo fabricante, com 100% de sensibilidade para o diagnóstico de infecção aguda. Entretanto, quando aplicada na exclusão dos pacientes CR, o ELFA permitiu excluir 70% dos pacientes do grupo CR, uma vez que, de 28 pacientes, 7 ainda apresentavam índice de avidéz intermediário ou baixo sendo, portanto, classificados erroneamente como pacientes agudos.

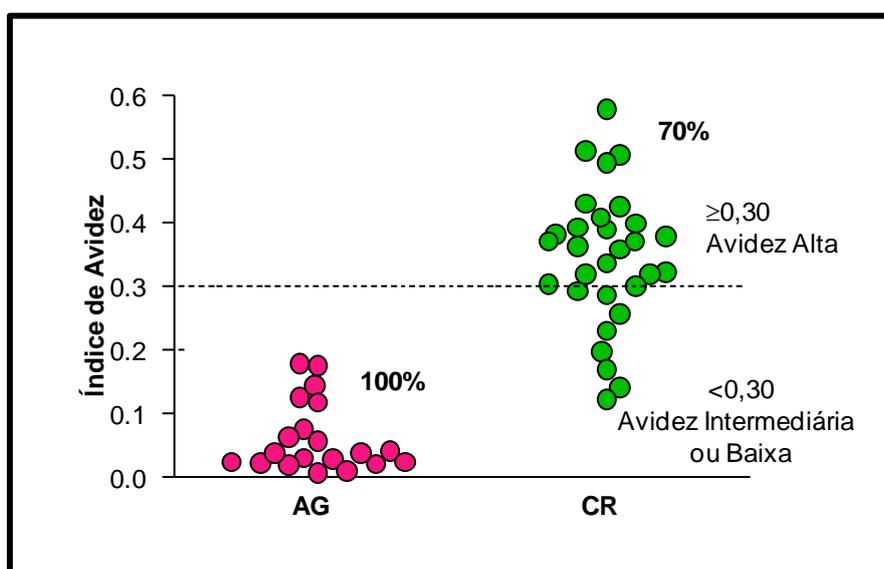


Figura 32 – Análise dos Índices de Avidéz de IgG por ELFA, em soros individuais de pacientes dos grupos AG (n=18 ●) e CR (n=28 ●), empregando IA $\geq 0,30$ (linha pontilhada) como ponto de corte. Os resultados mostram a sensibilidade de 100%, e especificidade de 70% do ELFA aplicada em soros de pacientes dos grupos AG e CR.

No entanto, quando foram avaliados simultaneamente os resultados obtidos pelos ensaios de pesquisa de IgM e o ensaio de avidéz de IgG pelo ELFA (Figura 33), verificou-se que dos 28 pacientes avaliados do grupo AG, todos (100%) apresentaram valores $>0,65\text{UI/ml}$ para IgM (resultado positivo), e índice de avidéz baixo ($<0,3$) confirmando infecção recente. No entanto dos 28 pacientes do grupo CR, a grande maioria 24 (85,7%) apresentaram resultados superiores a $0,65\text{UI/ml}$ para IgM (IgM residual), dentre esses, 7 (25%) ainda apresentaram índice de avidéz baixo ($<0,3$). Dessa forma, os 5 pacientes do grupo CR que apresentaram resultados de IgM residual, ou seja, com valores $>0,65\text{UI/ml}$ para pesquisa de IgM foram, também, classificados, erroneamente, como agudos nos ensaios de avidéz.

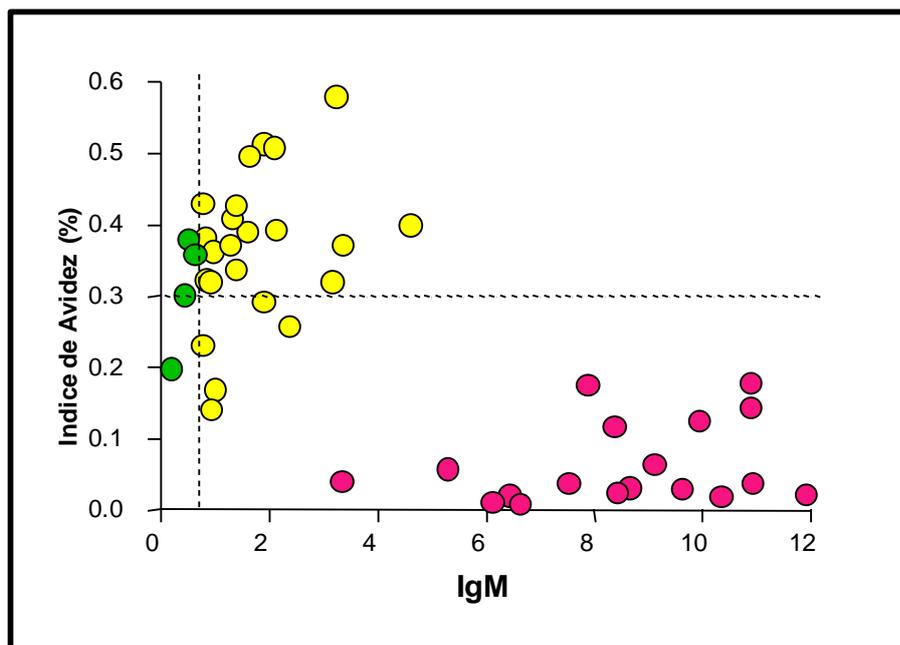


Figura 33 – Comparação dos resultados da pesquisa de IgM e índice de avidéz de IgG pelo ELFA em soros de pacientes do AG (●) e CR (●). Pacientes com resultados IgM residual (●) foram encontrados no grupo CR.

A Tabela 7 resume as informações referentes à avaliação comparativa da pesquisa de IgM e da avidéz de IgG por citometria de fluxo, e do ensaio imunoenzimático (ELFA) aplicados ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e à exclusão da toxoplasmose crônica através de índices expressos em percentual, com seus respectivos intervalos de confiança a 95%. Os resultados mostram ganho relativo da citometria de fluxo em relação ao ELFA, expresso em porcentagem. Na análise de desempenho observa-se ganho real (superior a 10%) nos índices de especificidade em relação ao ELFA.

Tabela 7: Índices de desempenho do ELFA e da pesquisa de AATF IgM, expressos em porcentagem, no diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana.

Índices	Sens (%)	Esp (%)
IgM ELFA	100%	14,3%
AATF IgM	100%	90%
Ganho (%)	-	75,7%
Avidez de IgG ELFA	100%	70%
Avidez de IgG CF	100%	100%
Ganho	-	30%

Em vermelho está destacado o ganho considerado real (superior a 10%).

6. Estabelecimento de algoritmo para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana utilizando citometria de fluxo

A figura 34 resume os resultados encontrados nos ensaios de citometria de fluxo. Considerando a CF-AATF-IgM com critério inicial para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana foi possível diagnosticar todos os pacientes com toxoplasmose aguda (PPFP>40%) e excluir 100% dos indivíduos não-infectados (NI), 90% dos pacientes crônicos (CR) e 96% dos pacientes com outras condições clínicas. Posteriormente foi proposto FC-AATF-IgG para os pacientes positivos para com IgM (PPFP>40%), desses apenas 3 pacientes foram negativos para IgG (PPFP≤5%), entretanto eram pacientes que estavam no início da infecção e a realização da pesquisa de IgG após 30 dias confirma a infecção aguda através da soroconversão. Para os pacientes que foram positivos para IgG (PPFP>5%), foi realizada FC-AATF-Índice de Avidéz de IgG (IA) que confirmou 100% dos casos de infecção aguda (IA≤60%) e excluiu a possibilidade de infecção aguda para os 3 pacientes do grupos CR que possuía IgM residual, através de índice de avidéz alto (IA>60%). Para os 2 pacientes portadores de outras doenças, que apresentaram

resultados falso-positivos para pesquisa de IgM ainda serão realizados os ensaios para pesquisa de avidéz de IgG, entretanto acredita-se que a avidéz desses pacientes será alta (IA>60%). Assim de 133 amostras testadas foi possível encontrara 99% de resultados corretos.

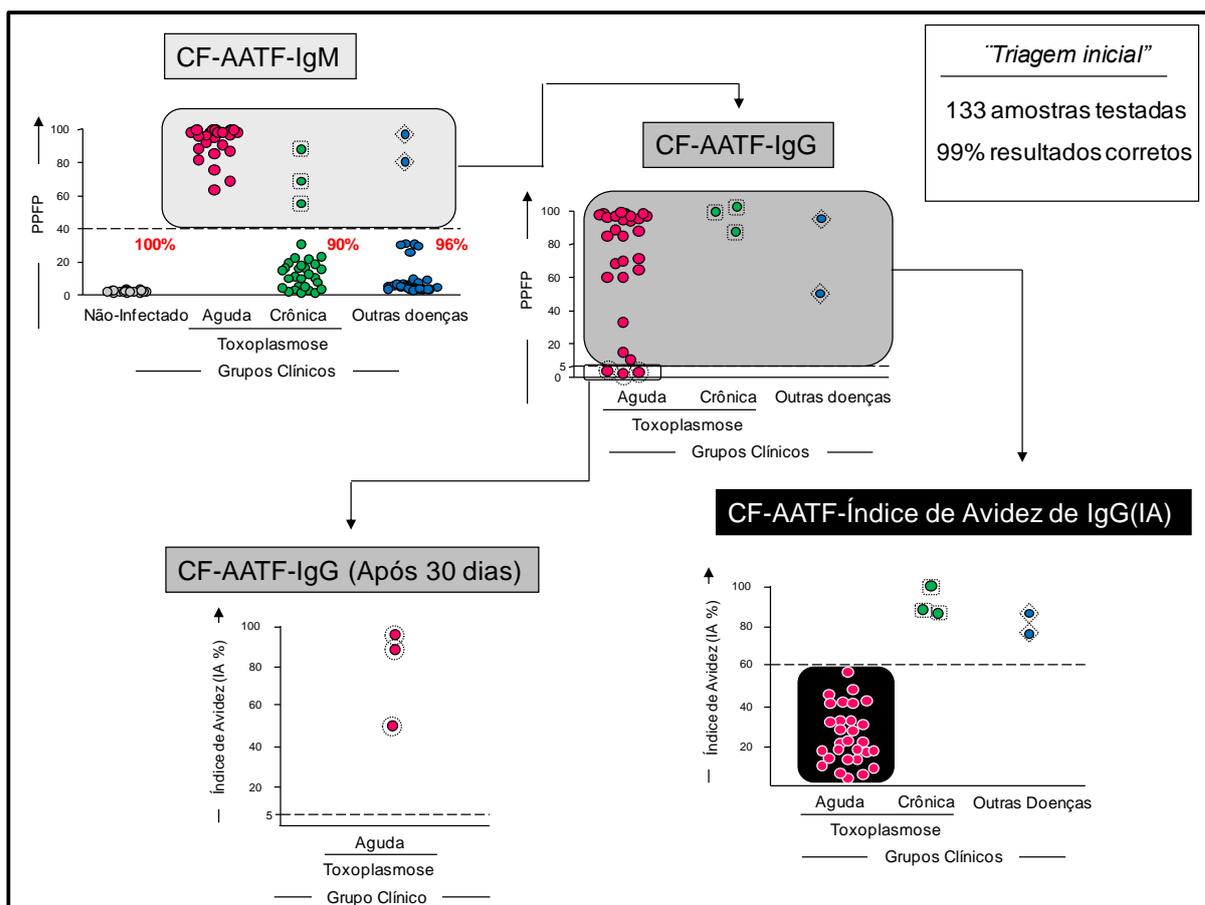


Figura 34: Resultados encontrados nos ensaios de citometria de fluxo para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana.

Baseando-se, portanto, nos resultados encontrados e no elevado desempenho da metodologia, foi proposto um algoritmo utilizando a pesquisa de AATF-IgM seguida da pesquisa de AATF IgG e determinação do índice de avidéz de IgG para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana (Figura 35).

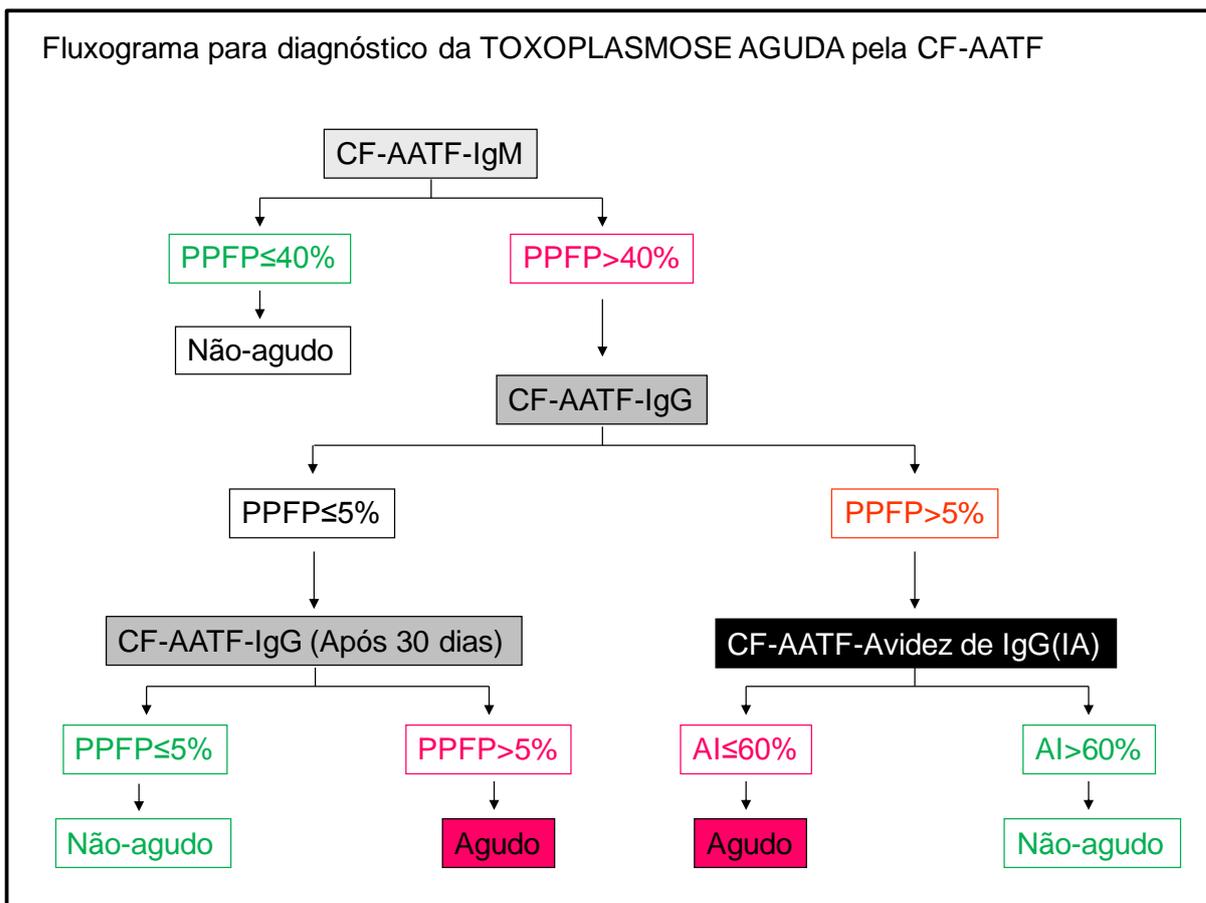


Figura 35 – Proposta de algoritmo para diagnóstico da toxoplasmose aguda humana utilizando CF-AATF.

Discussão

A sorologia continua sendo a principal abordagem para estabelecer o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose que, classicamente, tem se baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasito através de testes sorológicos. Segundo às características desses anticorpos, diferentes marcadores sorológicos têm sido descritos na tentativa de distinguir uma infecção latente, comum na população, de uma infecção recente. Entretanto, como anticorpos anti-*T. gondii* são comumente encontrados na população em geral, um teste sorológico positivo pode indicar infecção passada ou atual mas não, necessariamente, doença.

Outras respostas também são esperadas da sorologia da toxoplasmose, como em gestantes datar com precisão seu contágio pelo *Toxoplasma* e, assim, possibilitar a adoção de medidas profiláticas e terapêuticas para minimizar a transmissão vertical e a ocorrência de danos durante o desenvolvimento fetal (Wong & Remington, 1994; Remington et al., 2006). Além disso, em recém-natos espera-se confirmar ou afastar a ocorrência de transmissão congênita, e no paciente imunodeprimido, definir a reativação de toxoplasmose latente. Devido a essas interrogações, a sorologia da toxoplasmose apresenta-se como uma das mais complexas, em contínua evolução, exigindo maior variedade de testes e experiência para a realização e interpretação dos resultados.

O diagnóstico sorológico da infecção aguda primária por *T. gondii* há muito tempo baseia-se, principalmente, em testes que detectam a presença de anticorpos IgM específicos ou um aumento significativo nos níveis de anticorpos IgG. Entretanto, nos últimos anos a detecção de novos isotipos ou afinidade funcional (avidez) de IgG tem resultado na disponibilidade de novos ensaios que permitem uma melhor definição do estágio da infecção (Carvalho et al., 2008).

A utilização de métodos sorológicos, desde a reação de Sabin-Feldman (1948) até às mais recentes técnicas imunoenzimáticas, tem sido objeto de estudo e de muitos trabalhos. Porém, a utilização desses testes no diagnóstico da toxoplasmose aguda permanece com muitas interrogações porque a maioria deles não consegue datar a ocorrência de uma infecção aguda. Um dos fatores que têm atrapalhado o desempenho dos métodos sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose aguda, e que ainda constitui um desafio dentro da sorologia da toxoplasmose, está

relacionado à ocorrência de reações falso-negativas devido à presença de concentrações elevadas de anticorpos IgG com alta avidéz (Naot & Remington, 1980; van Loon et al., 1983; Mineo et al., 1986) e à persistência de anticorpos IgM em soros de alguns pacientes, por meses ou anos, após o início da infecção (Del Bono et al., 1989; Bobić et al., 1991; Liesenfeld et al., 1996; Liesenfeld et al., 1997; Bertozzi et al., 1999; Suzuki et al., 2001) levando à ocorrência de reações falso-positivas. Reações cruzadas também foram relatadas na presença de algumas condições clínicas como, citomegalovirose, rubéola e mononucleose infecciosa, devido a similaridades de alguns determinantes antigênicos (Takahashi & Rossi, 1994) ou à presença de fatores reumatóides e/ou nucleares (Araujo et al., 1971; Camargo et al., 1972; Camargo et al., 1978; Naot & Remington, 1980; van Loon et al., 1983; Mineo et al., 1986).

Com o objetivo de superar essas dificuldades vários trabalhos têm buscado desenvolver novas metodologias ou preparações antigênicas alternativas para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* que possam ser utilizadas para um diagnóstico seguro da toxoplasmose, e que ainda possa ser efetivo no diagnóstico diferencial da toxoplasmose aguda e crônica. No entanto, apesar de alguns deles apresentarem bom desempenho, nenhum tem apresentado 100% de sensibilidade e especificidade. Outro problema refere-se à escolha das amostras a serem utilizadas nesses estudos devido à dificuldade de se datar o início da infecção, o que prejudica sua classificação como decorrentes de infecção aguda ou crônica.

Um novo conceito introduzido a partir de 1999 na sorologia aplicada no laboratório clínico é a denominação “*detuned assay*” que trouxe uma nova abordagem e perspectiva para o desenvolvimento tecnológico. Esse conceito consiste em empregar paralelamente aos métodos convencionais, denominados altamente sensíveis, uma metodologia complementar que emprega amostras mais diluídas a fim de reduzir as reatividades interferentes indesejadas, sem que ocorra a perda da capacidade diagnóstica do método, o que significa um refinamento da metodologia.

Considerando o exposto, e na busca de novas perspectivas imunoserológicas para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho da reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo como uma nova abordagem sorológica, na linha de “*detuned assay*,” utilizando amostras

altamente diluídas dos soros testes na pesquisa dos isotipos IgM e IgG, subclasses de IgG anti-*T. gondii* e avaliação da avidéz de IgG aplicadas ao diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e exclusão da toxoplasmose crônica.

Para cumprir os objetivos propostos, inicialmente foram padronizadas todas as condições metodológicas, utilizando-se diferentes e altas diluições dos soros testes e conjugados avaliando-se as condições técnicas para análise dos resultados, tanto para o diagnóstico da toxoplasmose aguda como para exclusão da doença crônica.

Sabe-se que a avaliação da qualidade de um novo teste diagnóstico requer sua análise num grupo de pacientes, comprovadamente, portadores da doença relacionada ao teste em estudo (casos clínicos), nesse caso o grupo AG, e um grupo de pacientes, comprovadamente, sem a referida doença (controles), grupo NI. Como este estudo fazia parte de um estudo longitudinal da dinâmica de marcadores sorológicos na infecção aguda recente por *Toxoplasma gondii*, conseguiu-se incluir no grupo AG, pacientes que realmente encontravam-se na fase aguda da infecção por *T. gondii* com presença de sinais ou sintomas compatíveis e perfil sorológico típico de infecção aguda (IgG e IgM anti-*Toxoplasma* positivos e presença de IgG de baixa avidéz), coletados até dois meses após o início dos sintomas (± 15 dias).

Entretanto, neste estudo, além de se avaliar se o paciente possuía toxoplasmose aguda, objetivou-se avaliar também, se possuíam reatividade diferencial em relação aos pacientes crônicos, uma vez que numa situação real, a população seria avaliada ao acaso, e muitos autores relatam a persistência de anticorpos IgM anti-*T. gondii* em indivíduos que já tenham tido contato anterior com o parasito por muitos meses ou anos após a infecção. Para isso, o grupo CR foi composto pelos mesmos pacientes anteriores, cujas amostras de soro foram coletadas 12 meses após o início dos sintomas.

Para o estabelecimento do teste foi necessário definir, dentre as diluições realizadas de acordo com o protocolo da metodologia, qual seria a melhor escolha para a análise dos resultados obtidos, quando testados os soros de pacientes agudos (AG) e de indivíduos não-infectados (NI), assim como o de pacientes crônicos (CR).

Na análise inicial para a pesquisa de AATF IgM, as diluições 1:2.000, 1:8.000 e 1:32.000 mostraram-se capazes de segregar as reatividades sorológicas dos grupos

AG e NI, com resultados de PFP numa região de alta reatividade para o grupo AG, e de baixa reatividade para o grupo NI, considerando-se uma amplitude de segregação entre as reatividades médias dos grupos de, no mínimo, 70%. A análise dos índices de desempenho expressos em percentual, considerando como grupo controle apenas pacientes NI e os diferentes pontos de cortes fornecidos pela curva ROC, demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade para a pesquisa de AATF IgM em todas as diluições avaliadas quando aplicadas, apenas, ao diagnóstico da toxoplasmose aguda.

Vários estudos têm avaliado a sensibilidade e especificidade de diferentes metodologias para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose. Entretanto, na grande maioria deles, a especificidade tem sido baseada somente utilizando como grupo-controle indivíduos não-doentes. Isso contribui para uma elevada especificidade de algumas metodologias, não levando em conta o grande número de indivíduos que possuem a chamada toxoplasmose latente. Beghetto et al. (2006) ao avaliarem dois ensaios de ELISA recombinantes para a pesquisa de IgM encontraram 98% e 84% de sensibilidade e 100% de especificidade nos dois ensaios. No entanto, nesse estudo, os autores utilizaram como grupo-controle, pacientes IgG e IgM negativos para *T. gondii*.

Considerando-se o que foi exposto, posteriormente foi realizada uma nova avaliação dos dados utilizando-se dos mesmos critérios anteriores porém, foram utilizados os grupos AG e CR para realizar a exclusão dos pacientes CR do nosso grupo-problema. Para essa segregação, apenas a diluição 1:32.000 mostrou amplitude superior a 70%. A diluição escolhida foi, então, trabalhada na curva ROC para a definição do melhor ponto de corte para segregação dos pacientes. Dentre as possibilidades fornecidas pela curva ROC o ponto de corte de 40% PFP foi selecionado a fim de garantir a sensibilidade e especificidade da metodologia, minimizando eventuais oscilações de desempenho do método, quando aplicado numa amostragem distinta.

A aplicabilidade do método de citometria de fluxo para exclusão dos pacientes crônicos na população aqui estudada foi demonstrada, uma vez que a pesquisa de AATF IgM apresentou valores de PFP numa região de alta reatividade ou resultados positivos para 100% dos pacientes AG, e valores de PFP numa região

de baixa reatividade ou resultados negativos para 90% dos casos do grupo CR. Portanto, a pesquisa de AATF IgM mostrou-se capaz de excluir do grupo-problema, 90% dos pacientes que já tiveram contato anterior com o parasito, mas que não possuem doença aguda. Esse foi um achado importante em função da dificuldade de estabelecimento da segregação entre pacientes agudos e crônicos recentes, nas várias metodologias convencionais disponíveis.

As técnicas utilizadas para detecção de IgM merecem atenção especial na análise dos resultados encontrados. Uma vez que a utilização do teste de IFI convencional apresenta baixa sensibilidade e alta especificidade, levando a resultados falso-negativos, alguns testes ELISA, disponíveis comercialmente, apresentam grande variabilidade, principalmente no que diz respeito às preparações antigênicas utilizadas levando a uma variação dos índices de desempenho. Wilson et al. (1997) avaliaram seis testes comerciais para detecção de anticorpos IgM contra *T. gondii*, em uso nos Estados Unidos, e encontraram especificidade variando entre 77% a 99% quando comparados ao ELISA de referência, com um percentual importante de resultados falso-positivos.

Em estudo realizado por Liesenfeld et al. (1997), quando analisaram os resultados obtidos com o teste "IgM Platelia" para investigação de um surto de toxoplasmose, observaram que o teste era bastante sensível (99,4%) porém, pouco específico (49,2%).

Kodym et al. (2007) encontraram 21,4% de amostras positivas coletadas, acima de 3 anos, após o início de sintomas de toxoplasmose aguda através do ensaio ELISA IgM. Portanto, a persistência prolongada de anticorpos IgM tem se tornado cada vez mais comum, na medida em que se utilizam testes laboratoriais de alta sensibilidade.

Em outro estudo retrospectivo, conduzido por Garry et al. (2005), foram avaliados soros de mulheres suspeitas de toxoplasmose aguda, diagnosticadas através de testes comerciais e encontraram uma taxa de falso-positivos para pesquisa de IgM de 88,6%, índices de diagnóstico de 100% de sensibilidade e 11,4% de especificidade.

Comparado a esses achados, a pesquisa de AATF IgM por citometria de fluxo, mostrou maior capacidade de detecção de pacientes portadores da toxoplasmose

aguda e exclusão de infecção crônica, como demonstrado pelos índices de desempenho.

Outro parâmetro avaliado, a Razão de Verossimilhança (RV) também confirmou o alto desempenho da metodologia. Utilizando um ponto de corte de 40% de PPFP, o resultado positivo foi associado a uma $RV > 10$, o que significa dizer que um valor de $PPFP > 40\%$ é no mínimo 10 vezes mais provável de ser observado em pacientes AG em relação aos indivíduos CR. Assim, como o resultado negativo com $PPFP \leq 40\%$ teve $RV = 0,0$, pode-se dizer que esses resultados apresentam chance praticamente nula de advir de um paciente AG. Portanto, essas análises mostraram que resultados positivos para pesquisa de AATF IgM ($PPFP > 40\%$) contribuem para a confirmação da doença aguda, e ($PPFP \leq 40\%$) excluem esse diagnóstico.

Outro fator importante avaliado foi a presença de reatividade cruzada entre pacientes portadores de toxoplasmose e outras condições clínicas, quando se analisou a presença de IgM anti-*T. gondii*. Para isso, foram testados soros de pacientes portadores de doença de Chagas (CH), Malária (MAL), Leishmaniose Visceral (LV), Tuberculose (TB), Citomegalovírus (CMV), Epstein Barr (EBV), Herpes simples (HSV) e Fator anti-nuclear (FAN). A análise dos dados demonstrou reatividade cruzada apenas com dois soros de pacientes dos grupos MAL e CMV. Reações falso-positivas em pacientes portadores de rubéola e mononucleose infecciosa já haviam sido relatadas anteriormente por Takahashi & Rossi (1994) devido a similaridades de alguns determinantes antigênicos.

Visando, ainda, o desenvolvimento de um teste com maior especificidade no que diz respeito à exclusão de infecção crônica, o próximo passo foi avaliar a aplicabilidade da pesquisa de AATF IgG ao diagnóstico da toxoplasmose aguda e à exclusão da toxoplasmose crônica.

Para a pesquisa de AATF IgG, apenas a diluição do soro 1:32.000 mostrou-se capaz de segregar as reatividades sorológicas dos grupos AG e NI, baseando-se numa amplitude de segregação entre as reatividades médias de, no mínimo, 70%. Utilizando o ponto de corte de 5% de PPFP, definido pela curva ROC, foram encontrados 93,3% de sensibilidade, 100% de especificidade e acurácia global ($ASC = 0,98$), quando aplicadas, apenas, ao diagnóstico da toxoplasmose aguda.

Essa menor sensibilidade da pesquisa de AATF IgG pode ser atribuída à utilização de altas diluições do soro teste, principalmente quando se está avaliando soros de pacientes que estão no início da infecção, em fase de soroconversão. Assim, o teste estudado não consegue diagnosticá-los e necessita da utilização de diluições menores do soro para avaliar esses pacientes.

Entretanto, quando se avaliou a utilização da pesquisa de AATF IgG para exclusão dos pacientes CR, altos níveis de reatividade foram encontrados, tanto para os pacientes AG, quanto para os pacientes CR, o que não permitiu segregação entre os grupos. A presença de elevadas concentrações de anticorpos IgG por muitos anos após o início da infecção foi relatada por vários autores (Naot & Remington, 1980; van Loon et al., 1983; Mineo et al., 1986).

Devido à complexa estrutura antigênica de *T. gondii*, é de se esperar que os anticorpos formados em resposta a esses diferentes antígenos apresentem diferenças quanto a sua especificidade, isotipos e, também, subclasses de imunoglobulinas. Entretanto, poucos estudos na literatura relatam a pesquisa de subclasses de IgG no diagnóstico sorológico da toxoplasmose.

No presente estudo a pesquisa de AATF subclasses de IgG revelou que as diluições que se mostraram capazes de segregar as reatividades sorológicas dos grupos AG e NI, foram 1:32.000 para IgG1 e 1:400 para IgG2; já para as subclasses IgG3 e IgG4 foram encontradas duas diluições, 1:2.000/1:8.000 e 1:400/1:1.600, respectivamente. Utilizando o ponto de corte de 10% de PFP, definido pela curva ROC, foi encontrado que apenas as subclasses IgG2 e IgG4 apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade, e ASC de 1,00 quando aplicadas apenas ao diagnóstico da toxoplasmose aguda. Essas duas subclasses poderiam ser úteis no diagnóstico precoce da infecção, apresentando resultado positivo, quando o anticorpo IgG ainda estiver negativo ou em fase de soroconversão.

Contudo, quando se avaliou a utilização da pesquisa de AATF subclasses de IgG para exclusão dos pacientes CR, altos níveis de reatividade foram encontrados, tanto para os pacientes AG, quanto para os pacientes CR, independente da subclasse avaliada, não permitindo segregação entre os grupos e com perfil semelhante ao já encontrado para anticorpo IgG totais específicos.

Diferente dos nossos achados, Béla et al. (2008) ao avaliarem a reatividade de anticorpos IgG e IgG1, através de imunoenaios em soros de pacientes nas fases aguda e crônica, encontraram no ensaio ELISA indireto para IgG1, utilizando o antígeno recombinante SAG2a, um valor significativamente maior para a sensibilidade do ensaio em soros de fase aguda (90%) do que em soros de fase crônica (67%), quando comparado ao ensaio ELISA utilizando antígeno solúvel.

Mediante os resultados descritos acima, e considerando que baixos títulos de IgM podem ser detectados em muitos pacientes por períodos que ultrapassam a fase aguda da infecção, a detecção isolada do anticorpo IgM como critério de infecção aguda tem se mostrado inadequada (Liesenfield et al., 2001). Por essa razão, a determinação da avidéz de anticorpos IgG tem se tornado uma importante ferramenta auxiliar para o diagnóstico confirmatório da toxoplasmose aguda humana (Lappalainen & Hedman, 2004; Liesenfield et al., 2001).

Portanto, neste estudo, avaliou-se também o índice de avidéz de anticorpos IgG por citometria de fluxo, como uma ferramenta adicional ao diagnóstico confirmatório da toxoplasmose aguda e exclusão da toxoplasmose crônica.

Na etapa de padronização foram definidas as quatro diluições do soro a serem utilizadas nos ensaios: 1:32.000, 1:128.000, 1:512.000 e 1:2.048.000 tratados ou não com uréia, que foram as mesmas utilizadas nos ensaios para a pesquisa de AATF IgG. Entretanto, para o cálculo do índice de avidéz foi utilizada a última diluição do soro que apresentava valores de PFP superiores a 30% no teste sem tratamento com uréia, uma vez que o uso de valores menores que 30% de PFP os índices de avidéz apresentaram resultados inconsistentes.

Segundo Lappalainen & Hedman (2004), o índice de avidéz pode ser calculado de diferentes maneiras, seja pelo deslocamento da curva de titulação de anticorpos, devido à ação do agente desnaturante da proteína, ou pela concentração do desnaturante que reduz a absorvância dos ensaios em 50% ou, ainda, pela proporção de IgG que é resistente à ação do desnaturante, expressa pela razão das absorvâncias de uma diluição única do soro. Essas abordagens são as mais utilizadas no diagnóstico. O benefício da comparação dos títulos dos “*end-point*”

(com ou sem uréia) é que o resultado de avidéz de IgG (expresso em percentagem) é independente da concentração de IgG.

Portanto, o título está relacionado à quantidade de anticorpos circulantes; já a avidéz está associada à qualidade dos anticorpos refletindo, indiretamente, a seleção de clones de células B envolvidas nos processos de maturação da produção desses anticorpos e no estabelecimento de células de memória. Por isso, neste trabalho, foi importante estabelecer um valor mínimo de 30% de PFP a fim de se manter constante a concentração do anticorpo IgG e avaliar somente a sua afinidade funcional, sem a interferência das altas concentrações desse anticorpo.

Em estudo recente, Macre et al. (2009) avaliaram o desempenho do ensaio de ELISA avidéz de IgG utilizando o antígeno recombinante ROP2, e para a determinação do índice de avidéz consideraram as várias diluições dos soros que foram realizadas em cada ensaio. Mas para o cálculo do índice de avidéz utilizaram, apenas, a diluição que dava uma densidade óptica sem o agente caotrópico entre 0,5-1,5, eliminando, assim, a interferência da concentração do anticorpo IgG.

Outra limitação está relacionada à definição de pontos de corte para baixa e alta avidéz que é bastante variável entre os laboratórios (Petersen et al., 2005). Neste estudo, a determinação do ponto de corte dos índices de avidéz foi realizada utilizando a curva ROC. A análise dos resultados da curva ROC mostrou um excelente desempenho da pesquisa da avidéz de IgG empregando-se o ponto de corte de 60% de IA com sensibilidade e especificidade de 100% confirmando, assim, a perfeita acurácia do teste. Todos os pacientes AG apresentaram índices de avidéz de IgG menores que 60%, ao passo que todos os pacientes CR apresentaram índice de avidéz superiores a 60%; achado importante, uma vez que muitos autores têm relatado a presença de IgG de baixa avidéz por vários meses (Pelloux et al., 1998; Cozon et al., 1998). Esses autores propõem que a detecção de anticorpos de alta avidéz no primeiro trimestre da gestação afasta a possibilidade de primo-infecção na gravidez, mas a presença de IgG de baixa avidéz não confirma a doença aguda.

Por outro lado, acredita-se que a falta de padronização dos ensaios e a utilização de diluição única nos ensaios de avidéz, sem que ocorra a titulação do anticorpo IgG, têm levado a uma interpretação equívoca de muitos ensaios. Para Lappalainen &

Hedman (2004), índices simples (com ou sem uréia), obtidos a partir de diluição única do soro, tornaram-se insuficientes para a determinação da avidéz de IgG na toxoplasmose.

Portanto, pode-se dizer que elevados índices de resultados falso-positivos encontrados em vários ensaios para a pesquisa de anticorpos IgM anti-*T. gondii* fundamentam o conceito de que a presença isolada de anticorpos IgM não confirma o diagnóstico de infecção aguda. Por isso foram avaliados os resultados obtidos pelos ensaios de pesquisa de AATF IgM juntamente com o ensaio de avidéz de IgG por citometria. Os dados encontrados demonstraram que avidéz de IgG, por citometria de fluxo, é um excelente método para o diagnóstico confirmatório da infecção aguda e exclusão da crônica. Dos 10% dos pacientes CR que apresentaram resultados falso-positivos para a pesquisa de AATF IgM todos possuíam avidéz alta ($IA > 60\%$), afastando a possibilidade de infecção aguda, e a baixa avidéz ($IA \leq 60\%$) foi encontrada em 100% dos pacientes AG, confirmando a infecção aguda.

Jenum, Stray-Pedersen & Gundersen (1997) avaliaram 92 amostras IgM positivas com níveis de IgG superiores a 300 UI/ml, sugestivas de infecção recente e dessas, 72,8% possuíam avidéz alto, indicando que a infecção era de mais de 20 semanas.

Segundo Cozon et al. (1998), a toxoplasmose aguda foi excluída em 329 de 493 soros, utilizando o valor cut-off para avidéz de 35%. Em 99 amostras de 77 gestantes com infecção crônica e níveis baixos e estáveis de IgG e IgM, 35 amostras tinham avidéz entre 30 a 34%, 34 entre 25 a 29%, 16 entre 20 a 24% e 14 entre 11 a 19%. Baixa avidéz foi relacionada à infecção crônica em 60% dos casos, o que reduz seu valor para diagnóstico de infecção aguda segundo os autores. O índice de avidéz relacionado a tempo de infecção nesse trabalho pode ser, no entanto, questionado.

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

tinham alta avidéz de IgG. Os resultados assinalam o valor da alta avidéz em amostras obtidas no início da gestação.

Finalmente, o desempenho da citometria de fluxo foi comparado ao teste sorológico imunoenzimático (ELFA – *Enzyme Linked Fluorescence Assay*), automatizado no sistema VIDAS[®]. Os resultados mostraram um desempenho superior da citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos IgM anti-*T. gondii* e pesquisa da avidéz de IgG, especialmente em relação à especificidade da pesquisa de IgM anti-*T. gondii*. A pesquisa de AATF IgM apresentou apenas 10% de IgM residual, ao passo que o sistema VIDAS[®] apresentou 85,7%. Quanto à pesquisa da avidéz de IgG, a citometria de fluxo conseguiu eliminar a baixa avidéz residual nos pacientes do grupo CR encontrada pelo sistema VIDAS[®].

Na literatura há vários trabalhos utilizando esse mesmo sistema automatizado, entretanto, a baixa avidéz de IgG persistente tem sido bastante relatada no uso dessa metodologia. Montoya et al. (2002) avaliaram o kit VIDAS[®] no laboratório de referência *Palo Alto Medical Foundation Research Institute*, dos EUA. Nesse estudo foram avaliados soros de 132 gestantes com até 16 semanas de gestação, escolhidos devido ao fato de, pelo menos, um teste do painel de ensaios sorológicos, utilizado como referência, ter apresentado resultado compatível com uma infecção recém-adquirida. Os resultados demonstraram presença de IgG de alta avidéz em 75% dos 99 soros com IgM positiva pelo ELISA e 31,3% de 16 soros com infecção aguda. Além disso, uma percentagem significativa de soros com resultados IgM equívocos também demonstrava alta avidéz de IgG.

Por outro lado, resultados quantitativos de IgG, IgM e avidéz de IgG pelo sistema VIDAS[®] foram analisados por Pujol-Riqué et al. (2000) em 64 amostras IgG e IgM positivas, sendo 32 de 12 indivíduos infectados nas últimas 40 semanas (grupo 1) e, as restantes, de 17 indivíduos infectados há mais de 40 semanas (grupo 2). Um índice de IgM inferior a 1,05 foi associado a uma infecção de mais de 12 semanas e um índice de avidéz superior a 0,164 excluiu 100% das infecções com 12 ou inferiores a 12 semanas. Índices de avidéz maiores de 0,26 excluíram infecções nas últimas 20 semanas e de 0,45 nas 40 semanas precedentes. Assim, a alta avidéz de IgG, determinada pelo VIDAS[®] se restringe, apenas, em excluir infecção recente na maioria das amostras IgM positivas.

Baseando-se portanto nos resultados obtidos para a pesquisa de AATF IgM, IgG e avididade de IgG, foi possível propor um algoritmo que auxilia no diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana, através da citometria de fluxo com 100% de sensibilidade e 99% de especificidade.

Em suma, através deste trabalho, foi possível estabelecer e avaliar positivamente o desempenho de uma nova metodologia sorológica para a pesquisa de AATF e avididade de IgG. Essa metodologia demonstrou, através do seu desempenho, que pode ser um método alternativo para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana e exclusão da toxoplasmose crônica. Algumas características da metodologia de citometria de fluxo lhe têm proporcionado maior confiabilidade em relação às técnicas convencionais.

Vale ainda ressaltar que trata-se de um método com boa reprodutibilidade, com sensibilidade e especificidade superiores aos diferentes protocolos de detecção e revelação convencionais, e isento de variabilidade metodológica inerente ao analista. Além disso, a capacidade ajustável de analisar um grande número de parasitos por ensaio aumenta a confiabilidade do ensaio. A sensibilidade superior é, provavelmente, consequência das vantagens inerentes à metodologia de detecção por fotomultiplicadores que possibilitam o trabalho com maiores diluições das amostras que aquelas utilizadas nas metodologias convencionais, fornecem resultados fidedignos e, ainda, a possibilidade de utilizar parasitos íntegros como fonte de antígenos e não, apenas o antígeno solúvel, o que demonstra a importância dessa técnica sobre outras metodologias. É importante também mencionar que vários laboratórios têm investido na aquisição de um citômetro de fluxo que poderá permitir, no futuro, a implementação dessa nova metodologia.

No entanto, são ainda necessários novos trabalhos para a validação e consolidação do emprego da pesquisa de AATF e avididade de IgG como método sorológico alternativo em um laboratório de referência para toxoplasmose. Esses estudos futuros deverão abordar a aplicabilidade do uso da metodologia numa população que inclua outras situações relevantes, gestantes com toxoplasmose aguda, recém-natos com toxoplasmose congênita e a co-infectividade Toxoplasmose-HIV.

Conclusões

1. Fica padronizada a metodologia para a pesquisa de AATF IgM, IgG e subclasses de IgG e avides de IgG, por citometria de fluxo, aplicada ao diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda humana.
2. A análise do desempenho da metodologia para a pesquisa de AATF IgM mostrou 100% de sensibilidade e especificidade quando foram avaliados como controle soros de indivíduos saudáveis, e 100% de sensibilidade e 90% de especificidade utilizado como controle soros de pacientes crônicos.
3. Reatividade cruzada de IgM foi encontrada para soros de pacientes dos grupos MAL e CMV, que poderiam interferir no diagnóstico da toxoplasmose aguda.
4. A análise do desempenho da metodologia para a pesquisa de AATF IgG mostrou 93,3% de sensibilidade e 100% de especificidade quando foram avaliados como controle, soros de indivíduos saudáveis. A pesquisa de AATF IgG não permitiu segregação entre pacientes agudos e crônicos.
5. A análise do desempenho da metodologia para a pesquisa de AATF subclasses de IgG mostrou 100% de sensibilidade e especificidade apenas para as subclasses IgG2 e IgG4 quando foram avaliados como controle, soros de indivíduos saudáveis. Nenhuma das subclasses avaliadas permitiu segregar entre os grupos de pacientes agudos e crônicos.
6. A análise do desempenho da metodologia para a pesquisa de avides de IgG mostrou 100% de sensibilidade e especificidade quando foram avaliados soros de pacientes com toxoplasmose aguda e toxoplasmose crônica.
7. Os índices de desempenho expressos em percentual demonstram melhor desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por citometria de fluxo em relação ao sistema VIDAS[®] TOXO (ELFA – *Enzyme Linked Fluorescent Assay*) no diagnóstico da toxoplasmose aguda e exclusão da toxoplasmose crônica.
8. Foi possível estabelecer um algoritmo para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana.

Referências

Amato-Neto V, De Marchi CR. Toxoplasmose. In: Cimerman B, Cimerman S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo: Editora Atheneu; 1999. p.159-78.

Araujo FG, Barnett EV, Gentry LO, Remington JS. False-positive anti-Toxoplasma fluorescent-antibody tests in patients with antinuclear antibodies. *Appl Microbiol.* 1971 Sep; 22(3): 270-5.

Areal KR. Estudo de soroprevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas na rede municipal de saúde de Vitória, ES [dissertação]. Vitória (ES): Universidade Federal do Espírito Santo, 2007.

Ashburn D, Joss AW, Pennington TH, Ho-Yen DO. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? *J Clin Pathol.* 1998 Apr; 51(4): 312-5.

Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréface F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jan; 9(1): 55-62.

Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B. Risk factors for Toxoplasma infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand J Infect Dis.* 1999; 31(3):305-9.

Barros GC, Sessa PA, Barros RC. Toxoplasmosis in medical students. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1979 Jul-Aug; 21(4) :198-201.

Beghetto E, Buffolano W, Spadoni A, Del Pezzo M, Di Cristina M, Minenkova O, Petersen E, Felici F, Gargano N. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary Toxoplasma gondii infection during pregnancy. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec; 41(12): 5414-8.

Beghetto E, Spadoni A, Bruno L, Buffolano W, Gargano N. Chimeric antigens of Toxoplasma gondii: toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. *J Clin Microbiol.* 2006 Jun; 44(6): 2133-40.

Béla SR, Oliveira Silva DA, Cunha-Júnior JP, Pirovani CP, Chaves-Borges FA, Reis de Carvalho F, Carrijo de Oliveira T, Mineo JR. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Nov; 62(3): 245-54.

Bertozzi LC, Suzuki LA, Rossi CL. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1999 May; 41(3):175-7.

Bobić B, Sibalić D, Djurković-Djaković O. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. *Gynecol Obstet Invest*. 1991; 31(3): 182-4.

Bülow R, Boothroyd JC. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J Immunol*. 1991 Nov 15; 147(10): 3496-500.

Camargo ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1964 May-Jun; 12: 117-8.

Camargo ME, Leser PG, Rocca A. Rheumatoid factor as a cause for false positive IgM anti-*Toxoplasma* fluorescent tests. A technique for specific results. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1972 Sep-Oct; 14(5): 310-3.

Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immun*. 1978 Jul; 21(1): 55-8.

Camargo ME, da Silva SM, Leser PG, Granato CH. Avidity of specific IgG antibodies as markers of recent primary infection caused by *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991 May-Jun; 33(3): 213-8.

Carvalho FR, Silva DA, Cunha-Júnior JP, Souza MA, Oliveira TC, Béla SR, Faria GG, Lopes CS, Mineo JR. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Aug; 15(8): 1265-71.

Coêlho RA, Kobayashi M, Carvalho LB Jr. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003 Jul-Aug; 45(4): 229-31.

Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ*. 2000 Jul 15; 321(7254): 142-7.

Coutinho SG, de Souza WJ, Camillo-Coura L, Marzochi MC, Amendoeira MR. Results of indirect immunofluorescent reactions for toxoplasmosis in 6079 ambulatory patients or pregnant women in Rio de Janeiro during the years 1971 to 1977. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1981 Mar-Apr; 23(2): 48-56.

Cozon GJ, Ferrandiz J, Nebhi H, Wallon M, Peyron F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998 Jan; 17(1): 32-6.

de Andrade RA, Reis AB, Gontijo CM, Braga LB, Rocha RD, Araújo MS, Vianna LR, Martins-Filho OA. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007 Mar 15; 116(1-2):85-97.

Del Bono V, Canessa A, Bruzzi P, Fiorelli MA, Terragna A. Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol*. 1989 Sep; 27(9): 2133-5.

Desmots G, Couvreur J. Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull N Y Acad Med*. 1974 Feb; 50(2): 146-59.

Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*. 1980 Jun; 11(6): 562-8.

Desmonts G, Naot Y, Remington JS. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J Clin Microbiol*. 1981 Nov; 14(5): 486-91.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc*. 1970 Dec 1; 157(11): 1767-70.

Dubey JP, Beattie CT. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton: CRC Press; 1988. p. 232.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Apr; 11(2): 267-99.

Duermeyer W, van der Veen J. Specific detection of IgM-antibodies by ELISA, applied in hepatitis-A. *Lancet*. 1978 Sep 23; 2(8091): 684-5.

Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*. 1999 May 29;353(9167):1829-33.

Ferrandiz J, Mercier C, Wallon M, Picot S, Cesbron-Delauw MF, Peyron F. Limited value of assays using detection of immunoglobulin G antibodies to the two recombinant dense granule antigens, GRA1 and GRA6 Nt of *Toxoplasma gondii*, for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 Nov; 11(6): 1016-21.

Francisco F de M, de Souza SL, Gennari SM, Pinheiro SR, Muradian V, Soares RM. Seroprevalence of toxoplasmosis in a low-income community in the São Paulo municipality, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006 May-Jun; 48(3): 167-70.

Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. 1970 Feb 6; 167(3919):893-6.

Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around us. *BioScience* 1973; 23(2): 343-52.

Frenkel JK, Ruiz A, Chinchilla M. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg*. 1975 May; 24(3): 439-43.

Frenkel JK. *Toxoplasmose*. In: Veronesi R, Focaccia R, Dietze R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1991. p.734-49.

Fulton JD, Turk JL. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet*. 1959 Dec 12; 2(7111): 1068-9.

Garry DJ, Elimian A, Wiencek V, Baker DA. Commercial laboratory IgM testing for *Toxoplasma gondii* in pregnancy: a 20-year experience. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2005 Sep; 13(3): 151-3.

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Júnior M, Silveira S, Camargo ME, Nussenblatt RB, Kaslow RA, Belfort Júnior R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*. 1992 Aug 15; 114(2): 136-44.

Golkar M, Rafati S, Abdel-Latif MS, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H, Sima BK, Babaie J, Pelloux H, Cesbron-Delauw MF, Mercier C. The dense granule protein GRA2, a new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection: comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 Aug; 58(4): 419-26.

Hedman K, Lappalainen M, Seppälä I, Mäkelä O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis*. 1989 Apr; 159(4): 736-40.

Hegab SM, Al-Mutawa SA. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clin Exp Med*. 2003 Sep; 3(2): 84-105.

Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med*. 1994 Sep 15; 331(11): 695-9.

Holec L, Hiszczyńska-Sawicka E, Gasior A, Brillowska-Dabrowska A, Kur J. Use of MAG1 recombinant antigen for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Mar; 14(3): 220-5.

Holec-Gasior L, Kur J, Hiszczyńska-Sawicka E. GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Apr; 16(4): 510-4.

Hutchison WM, Dunachie JF, Work K. The faecal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1968; 74(3):462-4.

Jacobs L, Lunde MN. A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J Parasitol*. 1957 Jun;43(3):308-14.

Jacobs L, Remington JS, Melton ML. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 1960 Feb; 46:11-21.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of anti-toxoplasma immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol*. 1997 Aug; 35(8): 1972-7.

Jewell ML, Frenkel JK, Johnson KM, Reed V, Ruiz A. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. *Am J Trop Med Hyg*. 1972 Sep; 21(5): 512-7.

Kasper LH, Currie KM, Bradley MS. An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1985 May; 134(5): 3426-31.

Kodym P, Machala L, Roháčová H, Sirocká B, Malý M. Evaluation of a commercial IgE ELISA in comparison with IgA and IgM ELISAs, IgG avidity assay and complement fixation for the diagnosis of acute toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Jan; 13(1): 40-7.

Kravetz JD, Federman DG. Prevention of toxoplasmosis in pregnancy: knowledge of risk factors. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2005 Sep; 13(3): 161-5.

Lappalainen M, Sintonen H, Koskiniemi M, Hedman K, Hiilesmaa V, Ammälä P, Teramo K, Koskela P. Cost-benefit analysis of screening for toxoplasmosis during pregnancy. *Scand J Infect Dis*. 1995; 27(3): 265-72.

Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann Ist Super Sanita*. 2004; 40(1): 81-8.

Lemos EM, Gomes IT, Carvalho SF, Rocha RD, Pissinate JF, Martins-Filho OA, Dietze R. Detection of anti-leishmania (*Leishmania*) chagasi immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 May; 14(5): 569-76.

Letscher-Bru V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Filisetti D, Antoni E, Villard O, Klein JP, Candolfi E. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. *Infect Immun*. 2003 Nov; 71(11): 6615-9.

Liesenfeld O, Press C, Flanders R, Ramirez R, Remington JS. Study of Abbott Toxo IMx system for detection of immunoglobulin G and immunoglobulin M *Toxoplasma* antibodies: value of confirmatory testing for diagnosis of acute toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1996 Oct; 34(10): 2526-30.

Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, Remington JS. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) *Toxoplasma* antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *J Clin Microbiol*. 1997 Jan; 35(1): 174-8.

Liesenfeld O, Montoya JG, Kinney S, Press C, Remington JS. Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. *J Infect Dis*. 2001 Apr 15; 183(8): 1248-53.

Lopes FM, Gonçalves DD, Dos Reis CR, Breganó RM, Freire RL, de Freitas JC, Navarro IT. Presence of domesticated cats and visual impairment associated to

Toxoplasma gondii serum positive children at an elementary school in Jataizinho, state of Paraná, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2008 Jan-Mar; 17(1): 12-5.

Lynfield R, Guerina NG. Toxoplasmosis. Pediatr Rev. 1997 Mar;18(3):75-83.

Macre M de S, Pires M, Meireles LR, Angel SO, Andrade HF Jr. Serology using rROP2 antigen in the diagnostic of toxoplasmosis in pregnant women. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009 Sep-Oct; 51(5): 283-8.

Martin V, Arcavi M, Santillan G, Amendoeira MR, De Souza Neves E, Griemberg G, Guarnera E, Garberi JC, Angel SO. Detection of human Toxoplasma-specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant Toxoplasma gondii rop2 protein. Clin Diagn Lab Immunol. 1998 Sep; 5(5): 627-31.

Martins-Filho OA, Pereira ME, Carvalho JF, Cançado JR, Brener Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. Clin Diagn Lab Immunol. 1995 Sep; 2(5): 569-73.

Mineo JR, Camargo ME, Ferreira AW. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to Toxoplasma gondii polysaccharides in human toxoplasmosis. Infect Immun. 1980 Feb; 27(2): 283-7.

Mineo JR, Camargo ME, Ferreira AW, Almeida G. [Research on IgM anti-Toxoplasma gondii antibodies by using a reverse immunoenzymatic technic]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1986 Jan-Feb; 28(1): 6-11.

Mineo JR, Khan IA, Kasper LH. Toxoplasma gondii: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication. Exp Parasitol. 1994 Nov; 79(3): 351-61.

Montoya JG. Laboratory diagnosis of Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis. J Infect Dis. 2002 Feb 15; 185 Suppl 1: S73-82.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004 Jun 12; 363(9425): 1965-76.

Naot Y, Remington JS. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 1980 Nov; 142(5): 757-66.

Nicolle C, Manceaux L. On a leishman body infection (or related organisms) of the *gondi*. *Int J Parasitol*. 2009 Jul 1; 39(8): 863-4

Parmley SF, Sgarlato GD, Remington JS. Genomic and corrected cDNA sequence of the P28 gene from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Jan; 57(1): 161-5.

Pelloux H, Brun E, Vernet G, Marcillat S, Jolivet M, Guergour D, Fricker-Hidalgo H, Goullier-Fleuret A, Ambroise-Thomas P. Determination of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity: adaptation to the Vidas system (bioMérieux). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998 Oct; 32(2): 69-73.

Petersen E, Borobio MV, Guy E, Liesenfeld O, Meroni V, Naessens A, Spranzi E, Thulliez P. European multicenter study of the LIAISON automated diagnostic system for determination of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG avidity index. *J Clin Microbiol*. 2005 Apr; 43(4): 1570-4.

Pietkiewicz H, Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J, Petersen E, Nielsen HV, Stankiewicz M, Andrzejewska I, Myjak P. Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2004 Apr; 42(4): 1779-81.

Pissinate JF, Gomes IT, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA, Lemos EM. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 2008 Jul 31; 336(2): 193-202.

Pujol-Riqué M, Quintó L, Danés C, Valls ME, Coll O, Moreno A, Jiménez de Anta MT. Dating anti-*Toxoplasma* IgM in pregnancy using VIDAS-ELFA methods. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2000 Jun-Jul; 18(6): 274-8.

Rai SK, Matsumura T, Ono K, Abe A, Hirai K, Rai G, Sumi K, Kubota K, Uga S, Shrestha HG. High *Toxoplasma* seroprevalence associated with meat eating habits of locals in Nepal. *Asia Pac J Public Health*. 1999; 11(2): 89-93.

Redlich A, Müller WA. Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigen GRA6 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol Res.* 1998 Sep; 84(9): 700-6.

Remington JS, Gentry LO. Acquired toxoplasmosis: infection versus disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1970 Oct 30; 174(2): 1006-17.

Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker CJ, editors. *Infectious diseases of fetus and newborn infant.* Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. p. 947-1091.

Rey LC, Ramalho IL. Seroprevalence of toxoplasmosis in Fortaleza, Ceara, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1999 May; 41(3): 171-4.

Rocha RD, Gontijo CM, Elói-Santos SM, Teixeira Carvalho A, Corrêa-Oliveira R, Marques MJ, Genaro O, Mayrink W, Martins-Filho OA. Anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in american cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002 Nov-Dec; 35(6):551-62.

Rocha RD, Gontijo CM, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Corrêa-Oliveira R, Ferrari TC, Marques MJ, Mayrink W, Martins-Filho OA. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2006 Feb; 11(2): 156-66.

Ruiz A, Frenkel JK. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg.* 1980 Nov; 29(6): 1161-6

Sabin AB, Olitsky PK. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science.* 1937 Apr 2; 85(2205): 336-338.

Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science.* 1948 Dec 10; 108(2815): 660-663.

Sensini A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Jun; 12(6): 504-12.

Sukthana Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends Parasitol.* 2006 Mar; 22(3):137-42.

Suzuki LA, Rocha RJ, Rossi CL. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Med Microbiol.* 2001 Jan; 50(1): 62-70.

Suzuki Y, Ramirez R, Press C, Li S, Parmley S, Thulliez P, Remington JS. Detection of immunoglobulin M antibodies to P35 antigen of *Toxoplasma gondii* for serodiagnosis of recently acquired infection in pregnant women. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov; 38(11): 3967-70.

Takahashi EE, Rossi CL. Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* sIgA antibodies in acute toxoplasmosis. *J Clin Pathol.* 1994 Dec; 47(12): 1101-4.

Thulliez P, Remington JS, Santoro F, Ovlaque G, Sharma S, Desmonts G. A new agglutination reaction for the diagnosis of the developmental stage of acquired toxoplasmosis. *Pathol Biol (Paris).* 1986 Mar; 34(3): 173-7.

van Loon AM, van der Logt JT, Heessen FW, van der Veen J. Enzyme-linked immunosorbent assay that uses labeled antigen for detection of immunoglobulin M and A antibodies in toxoplasmosis: comparison with indirect immunofluorescence and double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1983 Jun; 17(6): 997-1004.

Vaz AJ, Guerra EM, Ferratto LC, de Toledo LA, Azevedo Neto RS. Positive serology of syphilis, toxoplasmosis and Chagas' disease in pregnant women in their first visit to health centers in a metropolitan area, Brazil. *Rev Saude Publica.* 1990 Oct; 24(5): 373-9.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Wendling AP, Rocha RD, Teixeira-Carvalho A, Martins NE, Dias JC, Rassi A, Luquetti AO, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-*Trypanosoma cruzi*

immunoglobulin G in the clinical laboratory. *J Immunol Methods*. 2007 Jan 10; 318(1-2): 102-12.

Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladehin B. A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J Clin Pathol*. 1976 Feb; 29(2): 150-3.

Walls KW, Bullock SL, English DK. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its microadaptation for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1977 Mar; 5(3): 273-7.

Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D. Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group. *J Clin Microbiol*. 1997 Dec; 35(12): 3112-5.

Wolf A, Cowen D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. *Bull Neurol Inst N Y* 1937; 6: 306-71.

Wong SY, Remington JS. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS*. 1993 Mar; 7(3): 299-316.

Wu K, Chen XG, Li H, Yan H, Yang PL, Lun ZR, Zhu XQ. Diagnosis of human toxoplasmosis by using the recombinant truncated surface antigen 1 of *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Jul; 64(3): 261-6.

Anexo

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO BIOMÉDICO

Vitória-ES, 31 de março de 2005

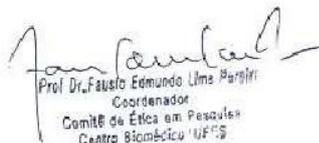
- Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico
- Para: Profa. Geisa Baptista Barros
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: “**Dinâmica de marcadores sorológicos na infecção aguda recente pelo Toxoplasma gondii**”

Senhora Pesquisadora,

Através deste informo à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa intitulado: “**Dinâmica de marcadores sorológicos na infecção aguda recente pelo Toxoplasma gondii**” e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, APROVOU o referido projeto, em reunião ordinária realizada em 30 de março de 2005.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro Biomédico UFES

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](#)