

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

**ALINE DE CASTRO ZACCHE TONINI**

**DESEMPENHO DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO, NO  
DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA**

VITÓRIA  
2014

ALINE DE CASTRO ZACCHE TONINI

**DESEMPENHO DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO, NO  
DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA**

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 Título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Elenice Moreira Lemos.

Coorientador: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira.

VITÓRIA

2014

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

---

T663d Tonini, Aline de Castro Zacche, 1987-  
Desempenho da técnica de citometria de fluxo, no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita / Aline de Castro Zacche Tonini – 2014.  
86 f. : il.

Orientador: Elenice Moreira Lemos.  
Coorientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Toxoplasmose congênita. 2. Citometria de fluxo. 3. Diagnóstico. I. Lemos, Elenice Moreira. II. Pereira, Fausto Edmundo Lima. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---



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

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda ALINE DE CASTRO ZACCHE apresentou a dissertação intitulada “Desempenho da Técnica de Citometria de Fluxo, no Diagnóstico Precoce da Toxoplasmose Congênita” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestra 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 decidiu (X) **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica ALINE DE CASTRO ZACCHE a obter o Grau de MESTRA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 04 de dezembro de 2014

Prof. Dra. Geisa Baptista Barros  
(Membro externo)

Prof. Dra. Blima Fux  
(Membro interno)

Prof. Dra. Elenice Moreira Lemos  
(Orientadora)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
(Coorientador)

Aos meus pais, pelo incentivo e amor que sempre recebi, ao meu esposo pela paciência e companheirismo e ao meu filho por me mostrar um novo jeito de ver a vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre me amparar nos momentos de dificuldades, mostrando-me que “os sofrimentos do tempo presente não podem ser comparados a glória a ser revelada em nós”. (Romanos 8:18);

À minha orientadora Dra Elenice Moreira Lemos pela oportunidade da realização do mestrado em seu laboratório. Agradeço por no meu momento de dificuldade pela compreensão e apoio oferecido para continuar a jornada com tranquilidade. Acima de tudo, por no seu momento de dificuldade continuar me orientando demonstrando mais uma vez sua força, compromisso e dedicação a pesquisa.

Ao Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor, da Universidade Federal de Minas Gerais, pela colaboração na disponibilização das amostras de soro do estudo;

Ao Dr. José Roberto Mineo e sua equipe do Laboratório de Imunoparasitologia, da Universidade Federal de Uberlândia, pela colaboração no preparo dos antígenos;

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho e suas alunas Samantha Ribeiro Béla e Jordana Reis, do Centro de Pesquisas René Rachou, pela disponibilidade e ajuda na análise dos dados;

A Dra Blima Fux, do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Espírito Santo, pelos ensinamentos no cultivo dos taquizoítas e auxílio neste estudo;

Ao Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, pela dedicação e empenho a pesquisa e por diversas vezes de forma tão gentil ter esclarecido minhas dúvidas e ter contribuído com seu imenso conhecimento no desenvolvimento do trabalho;

Aos professores do Programa da Pós-Graduação, pelo compromisso com a transmissão do conhecimento na realização das disciplinas;

A todos os amigos do Laboratório de Leishmaniose, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e pelos momentos agradáveis que convivemos. À Juliana e Renata, por terem me recebido tão bem no laboratório e ter compartilhado seus conhecimentos. À Priscila, pela generosidade em transmitir o conhecimento das etapas do experimento em citometria. À Kamila, por ser sempre tão gentil e pela sua ajuda no aprendizado na preparação dos antígenos; À Laura, por dividirmos as experiências e angústias de bancada e pelo fornecimento dos dados do experimento de avidéz; À Giuliana Fonseca, pelos momentos de alegria nas incansáveis leituras no citômetro e por toda a ajuda na realização dos experimentos. À ela toda minha gratidão pela preocupação com a realização do trabalho e com meu bem estar;

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, por todo auxílio durante o mestrado;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e ao NDI pelo apoio financeiro;

Aos meus pais, por serem sempre tão presentes na minha vida com apoio e palavras de incentivo. Obrigada pelo amor constante que recebo de vocês;

Ao meu marido, pela compreensão e amparo nos meus momentos de ansiedade e por me ajudar com todo seu amor a acreditar em mim;

Ao meu filho, por nos momentos de preocupação me dar a paz com sua alegria e inocência de criança;

Aos meus sogros Graça e Luiz Marcos, por de forma tão carinhosa terem cuidado do Matheus para que eu pudesse ter tranquilidade para voltar aos estudos.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar



## RESUMO

O diagnóstico de rotina pós-natal da toxoplasmose congênita é baseado na detecção de anticorpos IgM e/ou IgA anti-*T. gondii* no soro dos neonatos. No entanto, em um número significativo de neonatos infectados esses anticorpos não são detectados, dificultando o diagnóstico precoce da doença. Portanto, neste estudo foi avaliado o desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por citometria de fluxo no diagnóstico sorológico pós-natal precoce da toxoplasmose congênita. Foram avaliados 88 amostras de soro de crianças com infecção congênita pelo *T. gondii* (TOXO) e 19 amostras de soro de crianças não infectadas (NI). A sensibilidade do teste foi de 47,6% para IgM, 72,6% para IgA e 75% para IgG, com 100% de especificidade para todos os testes. Quanto a pesquisa de subclasses de IgG, a sensibilidade foi de 73,9% para IgG1, 60,2% para IgG2 e 83% para IgG3 com 100% de especificidade para todos os testes. A sensibilidade de IgG4 foi superior às demais, alcançando 94,7%, embora apresentou uma baixa especificidade de 4,6%. A pesquisa da avidéz de IgG quando aplicada para segregação dos grupos TOXO e NI, apresentou um ótimo desempenho com 97% de sensibilidade e 93% de especificidade. Foi também realizado uma análise comparativa da presença de IgG e IgG3 em crianças do grupo TOXO e NI com suas respectivas mães. Nossos resultados mostraram que as crianças infectadas apresentaram uma reatividade média desses anticorpos equivalentes a de suas respectivas mães, o que sugere estarem sintetizando estes anticorpos em resposta a infecção pelo *T. gondii*. Em contraste, as crianças não infectadas apresentaram uma menor reatividade média desses anticorpos em relação à suas respectivas mães. Além disso, nosso estudo propôs um algoritmo para o diagnóstico da toxoplasmose congênita utilizando o teste de IgM por métodos convencionais disponíveis na rotina dos laboratórios clínicos como estratégia inicial seguido da pesquisa de IgG3 e avidéz de IgG pela citometria de fluxo com desempenho final de 98% de sensibilidade e 93% de especificidade. A análise dos dados demonstrou a aplicabilidade da citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos IgG3 e avidéz de IgG anti-*T. gondii* como uma ferramenta complementar para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.

**Palavras-chave:** Toxoplasmose congênita, citometria de fluxo, diagnóstico sorológico.

## ABSTRACT

The routine diagnosis of pos-natal congenital toxoplasmosis is based on the detection of IgM and/or IgA anti-*T. gondii* antibodies in neonates sera. However, in a significant number of infected newborns these antibodies are not detected, hindering the early diagnosis of the disease. Therefore, in this study it was evaluated the performance of the detection of anti-*T. gondii* antibodies by flow cytometry in the serological diagnosis of early pos-natal congenital toxoplasmosis., Eight eight sera samples of children with congenital infection by *T.gondii* (TOXO) and 19 sera samples of uninfected children were evaluated. The sensitivity of the test was 47.6% for IgM, 72.6% for IgA, and 75% for IgG, with 100% of specificity for all tests. As to the IgG subclasses, the sensitivity was 73.9% for IgG1, 60.2% for IgG2, and 83% for IgG3 with 100% of specificity for all tests. The sensitivity of IgG4 was superior to the aforementioned subclasses reaching 94.7%, although achieved a poor specificity of 4.6%. The IgG avidity when employed to segregate TOXO and NI groups presented a great performance, with 97% of sensitivity and 93% of specificity. It was also done a comparative analysis of the presence of IgG and IgG3 in children of TOXO and NI groups with their respective mothers. Our results showed that the children with congenital toxoplasmosis presented an average reactivity of these antibodies equivalent to their respective mothers, which suggests that they are producing antibodies in response to *T.gondii* infection. In contrast, uninfected children presented a lower average reactivity of those antibodies in comparison to their respective mothers. In addition, our study proposed an algorithm for the diagnosis of congenital toxoplasmosis using IgM test performed by conventional methods available in routine clinical laboratories as the initial approach followed by the search for IgG3 and IgG avidity using flow cytometry, reaching a final performance of 98% of sensitivity and 93% of specificity. Data analysis showed the applicability of flow cytometry for the detection of IgG3 antibodies and IgG anti-*T. gondii* avidity as a complementary tool for the early diagnosis of congenital toxoplasmosis.

**Keywords:** Congenital toxoplasmosis, flow cytometry, serological diagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ciclo de transmissão do *Toxoplasma gondii*.....21
- Figura 2** – (A) Diagrama com os resultados positivos (■) e negativos (□) para a pesquisa de anticorpos IgM, IgA e IgG em soros individuais de crianças com toxoplasmose congênita (TOXO) e de crianças não infectadas (NI). (B) Porcentagem de resultados positivos do grupo NI e TOXO utilizando o método ELFA para o diagnóstico de toxoplasmose congênita.....42
- Figura 3** - Desenho do esquema experimental para a pesquisa de anticorpos anti-taquizoítos fixados de *T. gondii* por citometria de fluxo.....46
- Figura 4** - Sequência de análise de anticorpos anti-taquizoítos 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 (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.....48
- Figura 5** – Curvas de titulação dos anticorpos IgM, IgA e IgG anti-*T. gondii* pela citometria de fluxo em soros individuais de crianças com toxoplasmose congênita (A) e não infectadas (B). O gráfico C representa as médias de reatividades dos grupos TOXO (●) e NI (●). Em cinza está destacada a diluição do soro que apresentou maior amplitude de segregação entre os grupos. Os resultados da reatividade dos anticorpos de cada grupo estão expressos em valores de PPFP.....52
- Figura 6** – (A) Curva TG-ROC da pesquisa de IgM, IgA e IgG anti-*T.gondii* pela citometria de fluxo em soros de crianças com toxoplasmose congênita e crianças não infectadas. Em cinza está destacado a escolha do ponto de corte. (B) Perfil de dispersão individual dos soros dos grupos TOXO (●) e NI (●) da diluição candidata.

A linha pontilhada refere-se ao ponto de corte selecionado pela curva TG-ROC. Tabela com os índices de desempenho dos testes. ASC= Acurácia; Sens.= Sensibilidade; Espec.= Especificidade; RV= Razão de Verossimilhança e VP= Valor Preditivo.....54

**Figura 7** – Curvas de titulação das subclasses de IgG anti-*T. gondii* pela citometria de fluxo em soros individuais de crianças com toxoplasmose congênita (A) e não infectadas (B). O gráfico C representa as médias de reatividades dos grupos TOXO (●) e NI (●). Em cinza está destacada a diluição do soro que apresentou maior amplitude de segregação entre os grupos. Os resultados da reatividade dos anticorpos de cada grupo estão expressos em valores de PFP.....56

**Figura 8** – (A) Curva TG-ROC da pesquisa de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*T.gondii* pela citometria de fluxo em soros de crianças com toxoplasmose congênita e crianças não infectadas. Em cinza está destacado a escolha do ponto de corte. (B) Perfil de dispersão individual dos soros dos grupos TOXO (●) e NI (●) da diluição candidata. A linha pontilhada refere-se ao ponto de corte selecionado pela curva TG-ROC. Tabela com os índices de desempenho dos testes. ASC= Acurácia; Sens.= Sensibilidade; Espec.= Especificidade; RV= Razão de Verossimilhança e VP= Valor Preditivo.....59

**Figura 9** – (Superior) Determinação das diluições do soro das amostras individuais do grupo TOXO (●) e NI (●) utilizadas no cálculo do índice de avidéz. (Inferior) Análise dos índices de avidéz dos grupos através do perfil de dispersão individual das amostras pela citometria de fluxo .....61

**Figura 10** – Comparação da reatividade média de crianças não infectadas (●) e suas respectivas mães (■) e crianças com toxoplasmose congênita (●) e suas respectivas mães (■) pela citometria de fluxo .....63

**Figura 11** – Algoritmo para o diagnóstico da toxoplasmose congênita utilizando IgM pelo método ELFA como teste inicial, seguido da pesquisa de IgG3 e avidéz de IgG ou seguido somente da avidéz de IgG pela citometria de fluxo .....65

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Anticorpos secundários utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.....46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AcM** - Anticorpo monoclonal

**AcP** - Anticorpo policlonal

**ASC** - Área sob a curva (acurácia)

**COEP-UFMG** - Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Minas Gerais

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DS-ELISA** - ELISA duplo sanduíche

**ELFA** - *Enzyme-Linked Fluorometric Assay*

**ELISA** - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

**Fab** - Fragmento de ligação com o antígeno

**Fc** - Fragmento cristalizável de imunoglobulina

**FITC** - Isotiocianato de fluoresceína

**FL1** - Fluorescência do tipo 1 (verde)

**FL2** - Fluorescência do tipo 2 (laranja)

**FSC** - Dispersão frontal (Tamanho), do inglês *Forward Scatter*

**GRAS** - Antígenos secretados dos grânulos densos

**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana

**IA** - Índice de avidéz

**ICAM-1** - Moléculas de adesão intercelular

**IFI** - Imunofluorescência Indireta

**IFN- $\gamma$**  - *interferon gamma*

**IgA** - Imunoglobulina A

**IgE** - Imunoglobulina E

**IgG** - Imunoglobulina G

**IgM** - Imunoglobulina M

**ISAGA** - Ensaio de Aglutinação por Imunoadsorção

**MIC** - Antígeno de micronema de *Toxoplasma gondii*

**NI** - Grupo de amostras de crianças não infectadas com *T. gondii*

**PBS** - *Phosphate buffered saline*

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**PETN** - Programa Estadual de Triagem Neonatal

**PPFP** - Porcentagem de Parasitos Fluorescentes Positivos

**ROPs** - Antígenos de roptrias de *Toxoplasma gondii*

**RV** - Razões de verossimilhança

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

**SAPE** - Estreptoavidina-ficoeritrina

**SFB** - Soro fetal bovino

**SSC** - Dispersão lateral (Granulosidade ou complexidade interna), do inglês *Side Scatter*

**STA** - Antígeno total solúvel do *T. Gondii*

**TG-ROC** - *Two-graph receiver operating characteristic*

**Th-1** - tipo celular T helper 1

**Th-2** - tipo celular T helper 2

**TOXO** - Grupo de amostras de crianças com toxoplasmose congênita

**U<sup>+</sup>** - Amostras tratadas com uréia

**U<sup>-</sup>** - Amostras não tratadas com uréia

**VP** - Valor preditivo

**WB** - *Western Blotting*

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 ASPECTOS GERAIS DA TOXOPLASMOSE.....	17
1.2 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.....	23
1.3 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.....	26
1.3.1 Diagnóstico Clínico.....	26
1.3.2 Diagnóstico Laboratorial.....	27
1.3.2.1 Diagnóstico laboratorial na gestante e no feto.....	28
1.3.2.2 Diagnóstico laboratorial no recém-nascido e na criança.....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	40
2.1 OBEJETIVO GERAL.....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	41
3.2 AMOSTRAS DE SORO.....	41
3.3 ANÁLISE DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> DETECTADOS PELO ENSAIO FLUORIMÉTRICO LIGADO A ENZIMA (ELFA), EM SOROS DE CRIANÇAS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E DE CRIANÇAS NÃO INFECTADAS.....	42
3.4 OBTENÇÃO E PREPARO DAS FORMAS TAQUIZOÍTAS DE <i>T. gondii</i> PARA OS ENSAIOS DE IMUNOFUORESCÊNCIA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	43
3.5 PESQUISA DE ANTICORPOS IgM, IgA, IgG E SUBCLASSES DE IgG ANTI-TAQUIZOÍTAS FIXADAS DE <i>T. gondii</i> E AVIDEZ DE ANTICORPOS IgG POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	43
3.6 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	47



3.7 ANÁLISE DO DESEMPENHO DO MÉTODO PARA O DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.....	48
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE IgM, IgA E IgG ANTI- <i>T. gondii</i> , DETECTADOS PELA CITOMETRIA DE FLUXO, EM SOROS DE CRIANÇAS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E DE CRIANÇAS NÃO INFECTADAS E SUA APLICABILIDADE NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.....	51
<b>4.1.1 Determinação da diluição do soro para a pesquisa de anticorpos IgM, IgA e IgG anti-<i>T. gondii</i> em soros de crianças com toxoplasmose congênita e de crianças não infectadas.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1.2 Avaliação do desempenho da pesquisa de IgM, IgA e IgG anti-<i>T.gondii</i> no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.....</b>	<b>52</b>
4.2 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE SUBCLASSES DE IgG ANTI- <i>T. gondii</i> , DETECTADOS PELA CITOMETRIA DE FLUXO, EM SOROS DE CRIANÇAS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E DE CRIANÇAS NÃO INFECTADAS E SUA APLICABILIDADE NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.....	55
<b>4.2.1 Determinação da diluição do soro para a pesquisa de subclasses de IgG anti-<i>T.gondii</i> em soros de crianças com toxoplasmose congênita e de crianças não infectadas.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2.2 Avaliação do desempenho da pesquisa de subclasses de IgG anti-<i>T.gondii</i> no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.....</b>	<b>57</b>
4.3 AVALIAÇÃO DA AVIDEZ DE IgG ANTI- <i>T. gondii</i> E SUA APLICABILIDADE NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.....	60
4.4 COMPARAÇÃO DO PERFIL DE REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> ENTRE AMOSTRAS PAREADAS DE MÃES E CRIANÇAS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E CRIANÇAS NÃO INFECTADAS.....	62
4.5 PROPOSTA DE ALGORITMO PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.....	63
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DA TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii* com distribuição geográfica mundial e alta prevalência sorológica (DUBEY; BEATTIE, 1988). Classificado como um protozoário intracelular obrigatório, o *Toxoplasma gondii* pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina e Família *Toxoplasmatidae* (DUBEY, 2010), o qual é capaz de infectar uma grande variedade de espécies de sangue quente, incluindo os humanos (TENDER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Este parasito foi descrito pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux em roedores silvestres africanos da espécie *Ctenodactylus gundi*, durante uma pesquisa sobre leishmaniose no laboratório do Instituto Pasteur, em Tunis. Inicialmente o parasito foi denominado de "*Leishmania gondii*", devido à sua similaridade com o protozoário *Leishmania spp.* No entanto, perceberam que se tratava de um novo organismo e em 1909 foi denominado de *Toxoplasma gondii*, baseado na morfologia do parasito em forma semelhante a arco (do grego: toxo = arco, plasma = forma) e no hospedeiro (NICOLLE; MANCEAUX, 1908, 1909). No Brasil, Alfonso Splendore em 1908 identificou o mesmo parasito nos tecidos de coelhos (SPLENDORE, 1908).

O primeiro relato de toxoplasmose em humanos foi feito pelo oftalmologista Janku, em 1923, na Tchecoslováquia, ao identificar cistos do parasito na retina de uma criança falecida aos 11 meses de idade com hidrocefalia congênita e microftalmia.

A importância da toxoplasmose em humanos permaneceu desconhecida até os primeiros relatos de casos de toxoplasmose congênita (SCHARTZMAN et al., 1948), descrito por Wolf, Cowen e Paige em 1939, que identificaram conclusivamente formas livres e intracelulares do parasito na autópsia de um bebê com encefalomielite e retinite (DUBEY, 2009). Entretanto, a alta prevalência da infecção em humanos em muitas áreas no mundo só foi conhecida a partir de 1948 com a introdução do teste do corante de Sabin & Feldman (SABIN; FELDMAN, 1948) que

---

permitiu o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose e contribuiu para que inúmeros pesquisadores pudessem realizar estudos epidemiológicos (DUBEY, 2008).

Apesar de diversos estudos terem sido realizados desde o início do século XX, o ciclo biológico do *T. gondii* somente foi definitivamente esclarecido em 1970 (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970; DUBEY, 2009), com a descoberta do ciclo parasitário sexual no gato e a disseminação de oocistos através das suas fezes (ROBERT-GANGNEUX, 2014). O ciclo biológico do *T. gondii* é do tipo heteroxeno facultativo, com uma fase de reprodução assexuada que ocorre em seus hospedeiros intermediários, que são os animais de sangue quente, incluindo mamíferos, aves e os seres humanos, e uma fase de reprodução sexuada que ocorre em seus hospedeiros definitivos, membros da Família *Felidae* (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970; DUBEY; FRENKEL, 1972), cujo representante mais importante na transmissão da doença para a espécie humana é o gato doméstico (HILL; DUBEY, 2002).

No ciclo biológico o parasito pode ser encontrado em três formas evolutivas: taquizoítos, forma livre invasiva que se multiplica rapidamente no interior do vacúolo parasitóforo de todos os tipos celulares dos vertebrados; bradizoítos, resultado da conversão de taquizoítos, forma evolutiva de multiplicação lenta presentes em cistos teciduais; e esporozoítos contidos no interior de um oocisto esporulado encontrados no ambiente (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

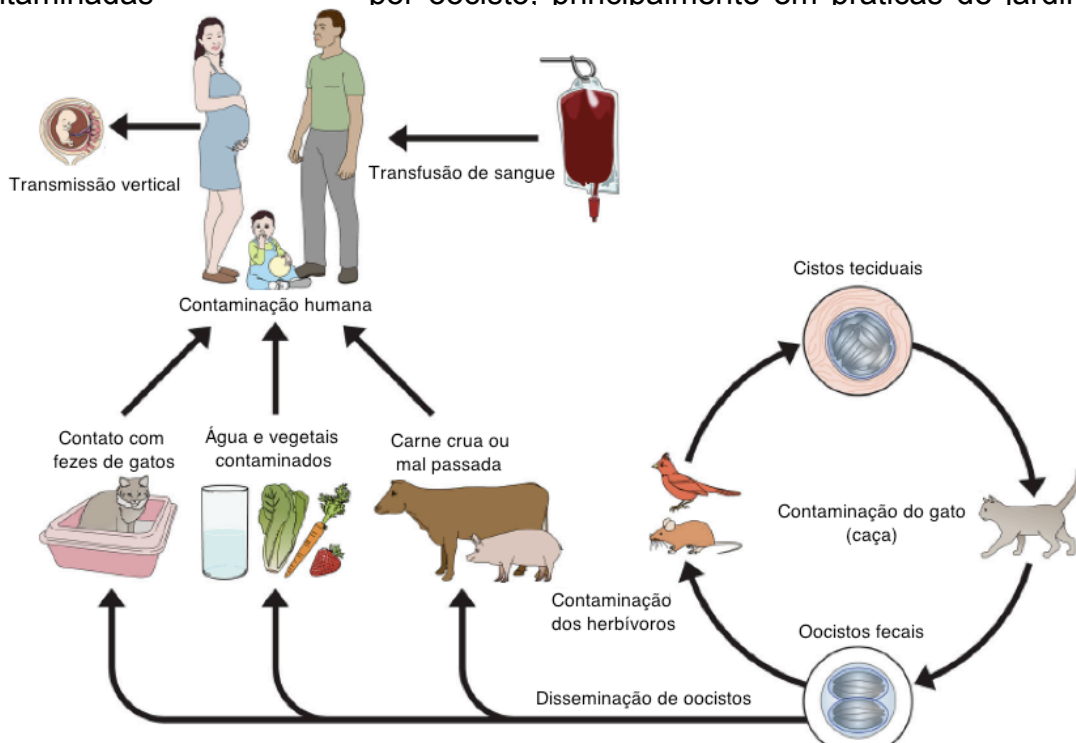
O ciclo biológico no hospedeiro definitivo ocorre nas células epiteliais do intestino delgado de gatos domésticos e outros felinos não imunes que ao se infectarem desenvolverão o ciclo sexuado do parasito (KAWAZOE; MINEO, 2011). Estes hospedeiros se infectam ingerindo qualquer uma das três formas do parasito, embora de forma menos eficaz pela ingestão dos oocistos e dos taquizoítos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Na reprodução sexuada, após os felídeos ingerirem cistos presentes nos tecidos de um hospedeiro intermediário, a parede do cisto é destruída por enzimas gástricas. Em seguida, os bradizoítos se estabelecem dentro de enterócitos, onde passam por multiplicações assexuadas por endodiogenia e merogonia, dando origem a vários merozoítos dentro de esquizontes

(DUBEY, 1998; DUBEY, 2009). O rompimento da célula parasitada libera os merozoítos que penetrarão em novas células epiteliais e se transformarão em formas sexuadas masculinas ou femininas, os gametócitos, que após um processo de maturação, formarão os gametas masculinos (microgameta) móveis e os gametas femininos (macrogameta) imóveis. As formas femininas permanecem nas células enquanto as formas masculinas saem e fecundam outras formas femininas, formando o zigoto (JONES; DUBEY, 2010). Este se desenvolverá dentro do epitélio formando uma parede externa dupla, dando origem aos oocistos que são liberados após o rompimento da célula epitelial ao lúmen intestinal (DUBEY, 2009) e excretados como formas não esporuladas nas fezes do animal, que no ambiente, sofrerá um processo de esporogonia e apresentará dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada (DUBEY, 1998). A eliminação de oocistos começa de três a sete dias após a ingestão de cistos e pode continuar por até 20 dias (DUBEY; FRENKEL, 1972). O oocisto em condições de umidade, temperatura e local sombreado adequado, é capaz de ser infectante em torno de 12 a 24 meses (KAWAZOE; MINEO, 2011).

No hospedeiro intermediário, o parasito sofre apenas desenvolvimento assexuado. Após a ingestão de oocistos maduros, os esporozoítos são liberados, penetram no epitélio intestinal, onde se diferenciam em taquizoítos. Estes se replicam rapidamente por endodiogenia dentro de vários tipos de células e disseminam-se por todo o organismo por meio da linfa e do sangue (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Esse período inicial da infecção é denominado de proliferativo, que caracteriza a fase aguda da doença e pode provocar um quadro polissintomático, cuja gravidade dependerá da quantidade de formas infectantes adquiridas, da susceptibilidade do hospedeiro e da cepa do parasito (TENDER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos desaparecem do sangue, da linfa e dos órgãos viscerais, ocorrendo uma diminuição da multiplicação intracelular. A partir de sete a dez dias após a infecção, surgem cistos teciduais como resultado da conversão de alguns taquizoítos em bradizoítos, devido ao desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro. Os bradizoítos contidos nos cistos, multiplicam-se lentamente por endodiogenia e podem permanecer ao longo da vida da maioria dos hospedeiros, principalmente no cérebro e musculatura esquelética e cardíaca, sem causar resposta inflamatória,

sendo assim, considerado o estágio crônico da doença (RORMAN et al., 2006). Após a ingestão destes cistos teciduais por um hospedeiro intermediário por meio do consumo de carne crua ou mal cozida, os cistos se rompem à medida que passam pelo trato digestivo, causando a liberação de bradizoítos. Os bradizoítos irão infectar o epitélio intestinal do novo hospedeiro e se diferenciar novamente em taquizoítos de divisão rápida disseminando por todo o organismo (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Raramente ocorre contaminação do hospedeiro pelos taquizoítos, devido à resistência dos mesmos ao suco gástrico. No entanto, os que penetram na mucosa são capazes de dar continuidade ao ciclo (KAWAZOE; MINEO, 2011).

No decorrer da evolução, o *T. gondii* desenvolveu várias vias potenciais de transmissão (TENDER; HECKEROTH; WEISS, 2000). As três formas evolutivas do *T. gondii* são infectantes tanto para os hospedeiros intermediários como para os hospedeiros definitivos, os quais adquirem o *T. gondii* principalmente por meio da transmissão horizontal (DUBEY; BEATTIE, 1988; EVANS, 1992). A maioria das transmissões horizontais é provocada pela ingestão de cistos contendo bradizoítas em tecidos de carnes cruas e mal cozidas ou pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos esporulados, provenientes do ambiente contaminado com as fezes de gatos infectados, que são as fontes de via oral mais importante de transmissão do *T. gondii* aos humanos (COOK et. al., 2000; BAHIA-OLIVEIRA et. al., 2003; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Menos frequentemente, a transmissão pode ocorrer também diretamente a partir de fezes de felinos contaminadas por oocisto, principalmente em práticas de jardinagem



im  
de  
N,  
É,

de

---

transmissão do *Toxoplasma gondii*

FONTE: Esch; Petersen, 2013

O *T. gondii* também pode ser transmitido verticalmente por meio dos taquizoítos, que podem colonizar os tecidos placentários no processo de disseminação e assim ter acesso ao feto (PFAFF et al., 2007) durante a infecção aguda primária na gestante (REMINGTON, 2006). Esta é a forma de transmissão que merece mais atenção uma vez que resulta na forma mais grave de infecção.

Outras formas menos comuns de transmissão são por meio da transfusão sanguínea por meio de taquizoítas no sangue do doador (RAISANEN, 1978), transplantes de órgãos contendo cistos teciduais (BROOKS; REMINGTON, 1986), acidentes de laboratório registrados por Remington e Gentry (1970) e ingestão de leite não pasteurizado de cabra (DUBEY, 2010) conforme observado por Sacks, Roberto e Brooks (1982), em grupos familiares nos Estados Unidos.

As infecções pelo *T. gondii* apresentam uma distribuição universal sendo mais comum em áreas com climas tropicais e muito úmidos (JONES; DUBEY, 2010). Estima-se que cerca de um terço da população no mundo tenha sido infectada com o parasito (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005), contudo a toxoplasmose em sua forma crônica é especialmente prevalente em alguns países da Europa, África e América do Sul (BOLLANI; STROCCHIO; STRONATI, 2013). No Brasil, nos diversos inquéritos epidemiológicos realizados, observou-se uma alta soroprevalência da toxoplasmose na população que variou de 21,5 a 83,8%, porém com amplas variações entre as regiões do país (DUBEY, 2012). A infecção em nosso meio foi geralmente associada com a ingestão de oocistos e particularmente afeta pessoas que vivem sob baixas condições socioeconômicas (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; CARELLOS et. al., 2014).

A prevalência da infecção pelo *T. gondii* pode apresentar uma grande variabilidade entre as áreas geográficas de um país e entre a população de uma mesma área (REMINGTON et al., 2001), que pode ser explicado por diversos fatores tais como hábitos alimentares, nível socioeconômico, condições ambientais favoráveis à sobrevivência de oocistos, as taxas de infecção em animais de produção, hábitos

higiênicos e a qualidade da água para consumo (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; JONES; DUBEY, 2010).

Embora a infecção por *T. gondii* em humanos seja muito comum, a gravidade da doença está relacionada ao estado imunológico da pessoa infectada. A maioria dos casos de toxoplasmose em seres humanos imunocompetentes são assintomáticos ou associados a sintomas auto-limitados, como febre, mal estar e linfadenopatia (JONES et al., 2001). No entanto, em indivíduos com deficiência imunológica e em fetos infectados congenitamente, a toxoplasmose pode causar doença grave ou até levar a morte (HILL; DUBEY, 2002). Portanto, o grande impacto da toxoplasmose humana deve ser considerado nesses dois grupos específicos de pacientes.

Em indivíduos imunocomprometidos, tais como aqueles submetidos a quimioterapia, transplantes de órgãos ou infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), a toxoplasmose quase sempre é decorrente de uma reativação da infecção crônica latente (JONES et al., 2001). Muitas vezes a reativação dos cistos, principalmente no cérebro, produz uma grave encefalite nestes pacientes (HILL; DUBEY, 2002).

Em mulheres que adquiriram uma infecção primária durante a gestação pode ocorrer o acometimento fetal, que varia desde a uma forma subclínica à significativa morbidade e mortalidade para o feto e recém-nascido, além de sequelas a longo prazo para crianças e adultos (BEN ABDALLAH et al., 2013).

## 1.2 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A infecção primária materna pelo *T. gondii* adquirida durante a gravidez pode ser transmitida via placenta para o feto e causar a toxoplasmose congênita. As consequências da infecção fetal são variáveis (BEN ABDALLAH et al., 2013). Nas crianças mais comprometidas pode ocorrer morte intrauterina (GOULART, 2004). Mesmo em crianças assintomáticas ao nascimento, podem ocorrer sequelas decorrentes do processo infeccioso que só irão aparecer no transcurso do desenvolvimento da criança (COUTO; AVELINO; FERREIRA, 2006).

---

A mulher quando adquire a infecção antes da gravidez não apresenta risco de transmitir a infecção para o seu filho, a menos que esteja imunodeprimida (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004). De Azevedo e colaboradores (2010) demonstraram, em seu estudo, a transmissão congênita do parasito em mulheres infectadas pelo HIV com infecção crônica pelo *T. gondii*, mas indicou que este evento é raro. Delicio e colaboradores (2011) também relataram a infecção congênita do *T. gondii* em crianças cujas mães estavam infectadas pelo vírus do HIV.

Excepcionalmente, foi descrito no estudo de Vogel e colaboradores (1996) e Villena e colaboradores (1998) que pode haver uma remota possibilidade de transmissão do parasito ao feto quando a infecção materna é adquirida poucas semanas ou até alguns meses antes da concepção.

O mecanismo de transmissão vertical ainda é desconhecido. O *T. gondii* é um dos poucos patógenos que conseguem atravessar a placenta (PFAFF et al., 2007). Um cenário provável é que durante a infecção primária, os parasitos atravessam a barreira intestinal e invadem os monócitos, que lhes permitem disseminar através do fluxo sanguíneo para praticamente todos os órgãos, incluindo a placenta (LAMBERT; BARRAGAN, 2010). A infecção do tecido placentário conseqüentemente gera focos inflamatórios que podem levar o *T. gondii* a invadir e se multiplicar dentro de células trofoblásticas, que forma uma barreira entre o sangue materno e o tecido fetal (ABBASI et al., 2003). Uma hipótese sugerida para a barreira placentária poder falhar ao proteger o feto e assim permitir a entrada do parasito, é que durante a gravidez um estado imunológico predominantemente anti-inflamatório ocorre para a manutenção da gestação, com uma resposta imune do tipo celular T helper 2 (Th-2) (SAITO, 2000). No entanto, considerando que uma resposta imunológica eficiente contra o *T. gondii* exige a via celular T helper 1 (Th-1), envolvendo a produção da citocina *interferon gamma* (IFN- $\gamma$ ) (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004), isso poderia facilitar a infecção do tecido placentário (BARBOSA et al., 2008). Além disso, estudos utilizando trofoblastos humanos da linhagem BeWo sugerem que o IFN- $\gamma$  regula a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) na superfície dos trofoblastos e assim, contribui para a adesão de monócitos infectados com *T. gondii*, facilitando a transmissão materno-fetal do



parasito. Após a infecção, os trofoblastos não são capazes de limitar a multiplicação do *T. gondii*, quando estimulados por IFN- $\gamma$ , diferente da maioria dos outros tipos de células (PFAFF et al., 2005). Isso nos demonstra o delicado equilíbrio existente entre o controle da infecção e a manutenção da gravidez (PFAFF et al., 2007).

O risco de infecção fetal pelo parasito é multifatorial, assim como a gravidade da doença, que dependem da idade gestacional em que a mãe adquiriu a infecção, da competência da resposta imunológica materna ao *T. gondii*, da carga parasitária e virulência da cepa inicial ou recorrente (TENDER; HECKEROTH; WEISS, 2000)

Após a infecção da gestante, o risco geral de infecção fetal é de aproximadamente 28%. Porém esse risco varia com a idade gestacional em que a mãe adquiriu a infecção, sendo rara se ocorrer antes da concepção e aumenta à medida que a gravidez avança. A infecção adquirida durante o primeiro trimestre de gravidez por mulheres sem tratamento resulta em uma frequência de transmissão materno-fetal do *Toxoplasma gondii* de 7 a 19%. Para as infecções que ocorrem durante o segundo e terceiro trimestres, a incidência de infecção fetal aumenta para cerca de 29% a 40% e de 44% a 72% respectivamente, com as maiores proporções nas últimas semanas antes do nascimento (MONTROYA; REMINGTON, 2008; SIALA et al., 2014).

De maneira inversa, os riscos de sintomas na toxoplasmose congênita e a gravidade da doença são maiores quando a infecção fetal ocorre nos estágios iniciais da gravidez, podendo causar aborto, morte fetal, crescimento intrauterino retardado, parto prematuro ou doença severa, principalmente nos tecidos dos olhos e cérebro (RORMAM et al., 2006). Isso pode ser explicado devido ao feto não apresentar maturidade imunológica para combater qualquer infecção no período inicial da gestação (COUTO; AVELINO; FERREIRA, 2006). Entretanto, quando a infecção ocorre tardiamente, as alterações clínicas podem manifestar-se em diferentes períodos da vida, sendo que na maioria dos casos a infecção é assintomática no neonato (LEBECH et al., 1996). Em 85 a 90% dos recém-nascidos a apresentação da toxoplasmose congênita é subclínica (REMINGTON et al., 2006).

No entanto, nos casos sintomáticos, que ocorrem em aproximadamente 10% das crianças infectadas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004), pode-se observar manifestações diversas e inespecíficas como linfadenopatia generalizada, hepatomegalia, esplenomegalia, hiperbilirrubinemia, trombocitopenia, anemia e anormalidades liquóricas (LEBECH et. al., 1996; BRASIL, 2011). Além disso, um percentual menor das crianças infectadas pode apresentar a téttrade clássica da toxoplasmose congênita, descrita inicialmente por Sabin em 1942, que consiste em hidrocefalia, calcificação intracraniana, retinocoroidite e retardo mental ou perturbações neurológicas, apresentando-se juntas ou em qualquer combinação (LEBECH et. al., 1996; MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Dentre estas, a manifestação mais comum da toxoplasmose congênita é a lesão ocular, que pode se apresentar como retinocoroidite, catarata, estrabismo ou nistagmo e até cegueira total, como foi observado em estudos no Brasil (DUBEY, 2012).

Ao contrário de outros estudos, recentemente, Capobianco e colaboradores (2014) em um estudo brasileiro, no Paraná, demonstraram que a maioria das crianças apresentou-se sintomáticas no primeiro mês de vida, com 68,9% manifestando alguma sequela, dentre as quais as mais frequentes foram a deficiência visual e os danos neurológicos. Em conformidade com os demais estudos no Brasil, a coriorretinite foi o dano ocular mais frequente, ocorrendo em 55,2% das crianças infectadas.

Na maioria das regiões do Brasil a soroprevalência da toxoplasmose em mulheres grávidas é de 50 a 80%. No município de Vitória, estado do Espírito Santo, 72,2% das gestantes apresentam anticorpos IgG anti-*T. gondii* (AREAL; MIRANDA, 2008). Embora a proporção de gestantes suscetíveis seja pequena, essas mulheres são propensas à infecção e a transmissão do *T. gondii* ao feto, pois elas vivem em um ambiente com um alto risco de contaminação (DUBEY, 2012). Esta característica epidemiológica é um dos fatores que contribuem para a elevada prevalência da doença no País. Existem poucos dados na literatura sobre a prevalência da toxoplasmose congênita no Brasil (NETO; AMORIM; LAGO, 2010). Mas um estudo realizado por Neto, Amorim e Lago (2010) revelou uma alta prevalência da toxoplasmose congênita no País, estimada pela triagem neonatal, com grande variabilidade dentro da população. A distribuição da prevalência entre os estados

variou de 2 a 20 casos por 10.000 crianças nascidas vivas no Brasil, evidenciando a real necessidade de desenvolver políticas de saúde e educação com intuito de prevenir e controlar a doença no País.

A toxoplasmose congênita é uma doença que pode ser prevenida e tratada (REMINGTON et al., 2006), porém se apresenta em nosso meio como um grave problema de saúde pública devido as importantes sequelas que podem ocorrer no feto e ao longo da vida da criança (GÓMEZ-MARÍN, 2010), causando grande ônus emocional e financeiro para os pais e sociedade (MONTROYA; ROSSO, 2005). Por isso a importância de se diagnosticar a gestante suscetível à infecção e a infectada agudamente e a criança com infecção congênita, para assim instituir medidas profiláticas e terapêuticas, a fim de reduzir a ocorrência da toxoplasmose congênita e suas complicações nas crianças infectadas (CAPOBIANGO et al., 2014).

### 1.3 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

#### 1.3.1 Diagnóstico Clínico

Como 90% das infecções pelo *T. gondii* são assintomáticas em pessoas imunocompetentes, logo, a maioria das mulheres grávidas com infecção aguda adquirida não expressam sinais e sintomas (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005). Entretanto, quando ocorrem manifestações clínicas durante a gravidez, em geral, são inespecíficas e consistem em febre, cefaléia, mialgia e linfadenopatia (MONTROYA; REMINGTON, 2008), o que torna o diagnóstico clínico difícil.

Assim como na gestante, a maioria das crianças com toxoplasmose congênita não manifestam sinais ou sintomas ao nascimento, apresentando uma infecção subclínica (CAPOBIANGO et al., 2014). Somente aproximadamente 10% das crianças apresentam manifestações clínicas precoces (ROBERT-GANGNEUX et al., 1999). Além disso, quando as manifestações clínicas da toxoplasmose congênita estão presentes, estas variam amplamente, sendo inespecíficas e também podem ter semelhanças com outras infecções congênitas, como o citomegalovírus, herpes simples, rubéola e sífilis (REMINGTON et al., 2001). Devido a nenhum sinal clínico

---

descrito no recém-nascido com toxoplasmose congênita ser patognomônico, por vezes, o diagnóstico clínico não apresenta características suficientes para o diagnóstico definitivo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Considerando que tanto a maioria das grávidas quanto os recém-nascidos são assintomáticos ou os sinais clínicos quando estão presentes são inespecíficos, a realização de testes laboratoriais torna-se imprescindível para a investigação e definição do diagnóstico definitivo da toxoplasmose congênita (NAESSENS et al., 1999; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

### **1.3.2 Diagnóstico Laboratorial**

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose congênita envolve, em primeiro lugar, a detecção da infecção aguda recente na gestante; e em segundo, a confirmação da infecção nos fetos e nos recém-nascidos de mães positivas ou com fortes suspeitas de infecção não diagnosticada (CARLIER et al., 2012), por meio da detecção direta ou molecular do parasito ou de ensaios sorológicos para a detecção de anticorpos específicos.

#### **1.3.2.1 Diagnóstico laboratorial na gestante e no feto**

Classicamente, a toxoplasmose congênita resulta quase sempre da ocorrência de uma infecção primária durante a gestação (SILVEIRA et al., 2003), desta forma é de extrema importância determinar se a infecção ocorreu realmente no período gestacional ou no passado (MONTROYA; REMINGTON, 2008).

O diagnóstico da toxoplasmose durante o período gestacional é baseada na detecção de imunoglobulinas G e M específicas (IgG e IgM) anti-*T. gondii* (KHAMMARI et al., 2013). A detecção de níveis elevados somente de anticorpos IgG indica que a infecção ocorreu, mas não distingue entre a infecção recente e a infecção adquirida no passado. Desta forma, a pesquisa de anticorpos IgM é

---

utilizada para determinar o tempo da infecção. Um resultado em que o teste de IgM seja negativo com IgG positivo, geralmente indica infecção ocorrida há pelo menos seis meses. No entanto, se o resultado da detecção de anticorpos IgM for positivo, a interpretação do diagnóstico torna-se complicada devido à presença de anticorpos IgM residual ou persistente por meses ou mesmo anos após a infecção primária (WILSON, 1999). Portanto, um teste IgM positivo isolado não tem condições de definir o diagnóstico de infecção aguda.

Assim testes auxiliares são necessários, pois irá permitir uma melhor definição do estágio da infecção materna (SENSINI, 2006) por meio da detecção de anticorpos IgA e IgE ou o uso de testes mais específicos como a avididade de IgG (MONTROYA, 2002).

A investigação da toxoplasmose congênita deve sempre partir da investigação do estado sorológico materno para determinar se há risco de infecção fetal. Uma vez estabelecida a soroconversão materna durante a gravidez ou quando existe uma forte suspeita ou em casos de anormalidade no ultrassom sugerindo toxoplasmose congênita torna-se necessário determinar se o feto está infectado ou não (HOHLFELD et. al., 1994; JONES et. al., 2003).

O diagnóstico no feto pode ser realizado por meio de testes parasitológicos convencionais como a inoculação em camundongos e cultura de células de fibroblastos de amostra do líquido amniótico, uma vez que as técnicas são mais sensíveis e específicas do que as técnicas sorológicas (FRICKER-HIDALGO et. al., 1997; FOULON et al., 1999). O isolamento por meio da inoculação em camundongos mostrou-se mais sensível porém, o método requer aproximadamente de 3 a 6 semanas para proporcionar um diagnóstico (FRICKER-HIDALGO et. al., 1997; GROVER et al., 1990).

Atualmente, o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita é baseado na técnica de biologia molecular com a análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do ácido desoxirribonucleico (DNA) do *T. gondii* no líquido amniótico e no acompanhamento da ultrassonografia fetal (ROMAND et al., 2001). Este método possui grande acurácia e resposta mais rápida que os métodos

---

convencionais, possibilitando um diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita (HOHLFELD et al., 1994). No entanto, os riscos inerentes à realização da amniocentese devem ser considerados.

Apesar das vantagens apresentadas, a utilização da técnica de PCR não está definitivamente padronizada quanto aos procedimentos de extração dos ácidos nucléicos ou aos segmentos amplificados e não há um consenso com relação ao melhor protocolo a ser utilizado, sendo a observação dos resultados por vezes divergentes entre os diversos laboratórios (KAISER et al., 2007; STERKERS et al., 2010).

### **1.3.2.2 Diagnóstico laboratorial no recém-nascido e na criança**

Os testes laboratoriais pós-natal são métodos complementares de extrema importância para detectar todos os casos de infecção que não são detectados pelo diagnóstico pré-natal ou quando esses não foram realizados (ROBERT-GANGNEUX et al., 2010).

Após o nascimento, o diagnóstico da toxoplasmose congênita pode ser realizado por exame parasitológico pela detecção do parasito na placenta e no sangue do cordão umbilical realizado pela inoculação em camundongos. Além desse, pode-se utilizar a técnica de biologia molecular com a detecção do DNA do parasito por PCR no tecido placentário ou ainda por meio de técnicas sorológicas no soro do recém-nascido para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* (NAESSENS et al., 1999; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

O desempenho do isolamento do *T. gondii* como ferramenta para o diagnóstico da toxoplasmose congênita foi demonstrado no estudo de Bessières e colaboradores (2001). Em seu estudo, os parasitos foram detectados em 61% dos recém-nascidos infectados por meio da técnica de inoculação em camundongos, mais frequentemente a partir de amostras do tecido placentário (60%) do que a partir de sangue do cordão umbilical (43%). Sendo assim, o isolamento do *T. gondii* na placenta foi mais efetivo na detecção da infecção, fato também demonstrado por

---

Naessens e colaboradores (1999). Esta técnica, porém, é de difícil execução e a obtenção dos resultados são mais demorados.

Devido a reação da PCR possuir uma eficácia comprovada no diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita, esperava-se que esta técnica poderia ter um bom desempenho no diagnóstico neonatal (NAESSENS et al., 1999). Um estudo que analisou a PCR em tecido placentário revelou um baixo desempenho da técnica, com uma sensibilidade de 25%, o que pode ser explicado devido a pequena quantidade de placenta utilizada no método (FRICKER-HIDALGO et al., 2007). Similarmente, Bessières e colaboradores (2009) também demonstraram uma baixa sensibilidade da PCR (52%) em seu estudo, concluindo que este método na placenta apresenta uma menor sensibilidade do que no líquido amniótico para a detecção do *T. gondii*, sendo a técnica mais útil no diagnóstico pré-natal. Em contraste, Robert-Gangneux e colaboradores (2010) demonstraram uma melhor sensibilidade da PCR (71%) em comparação a inoculação em camundongo (67%) na análise da placenta, com as especificidades de 97% e 100% respectivamente.

Como no neonato a sensibilidade dos métodos parasitológico e molecular é baixa, a detecção de anticorpos específicos no soro é essencial para o diagnóstico neonatal e pós-natal definitivo da toxoplasmose congênita (NAESSEN et. al. 1999; PINON et. al., 2001). Vale ressaltar que, na prática clínica, os testes sorológicos são mais utilizados, pois são mais disponíveis nos laboratórios e possuem resultados mais rápidos. Porém, devido o diagnóstico sorológico no período neonatal as vezes poder também apresentar-se complicado, o acompanhamento sorológico e clínico na criança se faz necessário para concluir definitivamente a presença ou ausência de infecção congênita (LEBECH et. al., 1996; LECOMTE et. al., 2006).

O diagnóstico sorológico baseia-se comumente na detecção de anticorpos específicos contra o parasito produzidos pelo feto ou mesmo pelos recém-nascidos. A detecção de anticorpos IgM, IgA ou IgE específicos, que não atravessam a barreira placentária, são importantes marcadores de infecção congênita (PINON et al., 1996). O diagnóstico pela detecção de anticorpos IgG presentes nos recém-nascidos é particularmente difícil pois estes anticorpos podem ser próprios do bebê

ou adquiridos da mãe, já que estes anticorpos atravessam a barreira placentária e atingem o sangue do feto.

Os anticorpos IgA são mais frequentemente detectados no soro de crianças infectadas do que os anticorpos IgM (BESSIÈRES et al., 2001). A presença destes anticorpos depende do tempo de soroconversão materna. Os anticorpos IgM são os primeiros a serem produzidos na vida intra-uterina, seguido de IgG e IgA. Assim, os anticorpos IgM podem não estar mais presentes no momento do nascimento quando a infecção materna ocorreu no início do período gestacional, enquanto que os anticorpos IgA produzidos mais tarde ainda estão presentes (BESSIÈRES et al., 1992; NAESSEN et al. 1999; WALLON et al., 1999).

O diagnóstico da toxoplasmose congênita pode tornar-se complicado se, após o nascimento, a criança não apresentar níveis significantes de IgM e IgA anti-*T. gondii* (PETERSEN, 2007). Nestes casos, o acompanhamento dos níveis de IgG deve ser realizado até um ano de vida. Na ausência de infecção congênita, os níveis de IgG desaparecem progressivamente com negatificação em torno dos primeiros 6 a 12 meses de vida (MONTROYA, 2002). Nas crianças infectadas ocorre aumento dos títulos de IgG pois começam a ser produzidos pelo organismo infectado. Sua persistência após um ano de vida é critério para o diagnóstico de toxoplasmose congênita (NAESSENS et al., 1999).

Preferivelmente, os testes sorológicos nos recém-nascidos são realizados em amostras de sangue periférico do que em sangue do cordão umbilical, devido a maior ocorrência de resultados falso positivos na análise do sangue do cordão umbilical, provavelmente por causa da contaminação com sangue materno no momento do parto (NAESSEN et al. 1999; BESSIÈRES et al. 2001; RABILLOUD; WALLON; PEYRON, 2010).

A sensibilidade e a especificidade da sorologia para o *T. gondii* difere segundo a natureza do estudo (BESSIÈRES et. al., 2009). Ao longo dos anos, diversos testes sorológicos têm sido desenvolvidos com o objetivo de melhorar o desempenho, a fim de obter um diagnóstico mais preciso da infecção congênita pelo *T. gondii* (WEISS; DUBEY, 2009).



O primeiro ensaio sorológico desenvolvido para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* foi a Reação de Sabin-Feldman (1948), também referida como Teste do Corante. A técnica consiste na incubação do soro do paciente em diluições seriadas com uma suspensão de taquizoítos vivos, complemento e o corante azul de metileno. Na ausência de anticorpos específicos no soro do paciente, os parasitos absorvem o corante tornando-se azuis enquanto que, na presença desses anticorpos específicos ocorre a ativação do sistema do complemento, consequentemente a lise da membrana celular dos taquizoítos, perdendo assim a capacidade de incorporar o corante (SUKTHANA, 2006). A reação é considerada ainda hoje como padrão ouro devido à alta sensibilidade e especificidade, porém é realizada por poucos laboratórios pelo inconveniente de utilizarem parasitos vivos.

Para a detecção de anticorpos IgM nos recém-nascidos, estudos realizados com o tratamento dos soros dos bebês com 2-mercaptoetanol antes do teste de Sabin-Feldman, não se mostrou útil para a demonstração de anticorpos IgM no período neonatal precoce, uma vez que o efeito do 2-mercaptoetanol em anticorpos IgM dos bebês foi por vezes mascarados pela presença de altos níveis de anticorpos IgG maternos (REMINGTON, 1969).

Tendo em vista as dificuldades para a execução da reação de Sabin-Feldman, muitos estudiosos se preocuparam em buscar outras técnicas capazes de determinar os anticorpos anti-*T. gondii* no soro. Kelen e colaboradores (1962) iniciaram trabalhos na adaptação do teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a avaliação quantitativa de anticorpos anti-*T. gondii* em soros humanos. Posteriormente, Garin e Ambroise-Thomas (1963) e Camargo (1964), afirmaram a boa concordância entre os resultados da IFI com o teste do corante, demonstrando ser de fácil execução sendo mais prático e seguro na rotina laboratorial do que a reação de Sabin-Feldman. Além disso, a técnica veio permitir a identificação dos anticorpos segundo as classes de imunoglobulinas em função do conjugado fluorescente utilizado (CAMARGO; LESER; ROCCA, 1972). Porém, o método de IFI para detectar os anticorpos IgM pode apresentar resultados falso negativos no período neonatal, pois altos títulos de anticorpos da classe IgG maternos podem competir com os sítios antigênicos na superfície do parasito, impedindo que os

---

anticorpos IgM do recém-nascido se fixem (FILICE; YEAGER; REMINGTON, 1980) ou resultados falso positivos pela interferência do fator reumatóide formado pela criança, eventualmente presentes no soro (CAMARGO; LESER; ROCCA, 1972). De fato, a sensibilidade para detecção de IgM pela IFI no neonato é muito baixa, com resultados falso negativos variando de 74,5 a 90% (NOAT; DESMONTS; REMINGTON, 1981; FAURE et al., 1999; GILBERT et al., 2007) não se mostrando ser uma ferramenta útil no diagnóstico pós-natal dos recém-nascidos infectados (FAURE et al., 1999).

A introdução de enzimas como marcadores de anticorpos proporcionou novas possibilidades na sorologia tais como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), descrito por Engvall e Perlmann (1971), originando testes práticos para fins de rotina (CAMARGO et al. 1978). Posteriormente, o método foi empregado para o diagnóstico de doenças parasitárias, na qual Dugimont e colaboradores (1975); Voller e colaboradores (1976) e Camargo e colaboradores (1978) descobriram que havia uma forte correlação entre os testes do corante, a IFI e as leituras do ELISA em pacientes expostos ao *T. gondii*. Desta forma, a introdução do ELISA trouxe um grande avanço para o diagnóstico da toxoplasmose. Porém, também foi observado a presença de resultados falso positivos para IgM em pacientes portadores de fator reumatóide (WALLS; BULLOCK; ENGLISH, 1977).

Diante de tal interferente, Naot e Remington (1980) desenvolveram uma técnica para detecção de IgM, denominada de ELISA duplo sanduíche (DS-ELISA IgM) para indivíduos com toxoplasmose aguda adquirida. É um teste de captura de IgM que visa eliminar falsos resultados, pois utiliza uma fase sólida sensibilizada com anti-IgM específico. Os soros dos pacientes são incubados, havendo a captura somente do anticorpo IgM da amostra. Em seguida, incuba-se com antígeno seguido de anticorpos específicos marcados (FERREIRA; MORAES, 2013). Esta técnica foi desenvolvida com a tentativa de evitar resultados falso negativos relacionados a competição com os altos níveis de IgG e falso positivos relacionados ao fator reumatóide e anticorpos anti-nucleares. Com as limitações existentes no diagnóstico da toxoplasmose congênita, Noat, Desmonts e Remington (1981) avaliaram o teste DS-ELISA-IgM em soros de recém-nascidos com suspeita de infecção congênita comprovada. Esses autores demonstraram que este teste era mais sensível e

preciso que o teste de IFI para a pesquisa de IgM anti-*T. gondii* em recém-nascidos infectados congenitamente pelo parasito.

Assim, novos pesquisadores buscaram avaliar o desempenho da técnica. Faure e colaboradores (1999) compararam a sensibilidade da detecção de IgM pelo DS-ELISA em amostras de soro e sangue do cordão umbilical de neonatos infectados, relatando uma maior sensibilidade na detecção de IgM em amostras de sangue do cordão umbilical (81,8%) que no soro (61,1%) do recém-nascido. Porém esta melhor sensibilidade verificada no sangue do cordão umbilical pode ser atribuída pela presença de anticorpos maternos transferidos passivamente ao neonato no momento do nascimento. Da mesma forma, Pinon e colaboradores (2001) e Gilbert e colaboradores (2007) também verificaram uma baixa sensibilidade no ensaio de DS-ELISA para a detecção de IgM anti-*T. gondii* e atribuíram esse baixo desempenho ao fato da coleta da amostra ter sido feita muito tempo após a infecção aguda e que a produção de IgM pode ter cessado na criança após ao nascimento devido ao período de soroconversão materna.

A contribuição da detecção de IgA pelo ensaio de DS-ELISA no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita também tem sido descrita (FAURE et al., 1999). Os anticorpos IgA específicos possuem o mesmo significado que os anticorpos IgM, embora alguns estudos descrevam uma maior sensibilidade da IgA no diagnóstico no neonato por ser sintetizada de forma mais duradoura. Contudo, a sensibilidade da detecção de IgA anti-*T. gondii* no soro de neonatos até 10 dias após o nascimento não excede a 71,4% (PINON et al., 2001).

Entre os marcadores de infecção congênita, estudos revelam que a detecção de IgE no momento do nascimento não é um indicador confiável, pois a IgE específica detectada foi menos frequente do que IgM ou IgA (VILLENA et al., 1999; FOU DRINIER et al., 2003).

Buscando alcançar melhorias na sensibilidade e especificidade dos testes para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose congênita, foi proposto um teste que combina as características do DS-ELISA e o teste de aglutinação direta. Desta forma esse novo método não requer o uso de um conjugado com enzima e permite a

utilização de uma preparação de antígeno particulado, descrito por Desmonts, Naot e Remington (1981) como Ensaio de Aglutinação por Imunoadsorção (ISAGA). Na técnica, placas de microtitulação são cobertas com anti-IgM ou anti-IgA. O soro do recém-nascido, em diluições crescentes, é adicionado sobre as cavidades o que permite a captura dos anticorpos IgM ou IgA, em seguida é adicionado uma suspensão de taquizoítas fixados pela formalina ou em partículas de látex, que se aglutinam na presença do anticorpo específico. A leitura da aglutinação permite expressar o título da amostra como a diluição mais alta do soro com forte aglutinação.

Neste cenário, o teste de imunocaptura ISAGA se apresentou mais sensível do que os métodos de imunofluorescência e imunoenzimáticos (DUFFY et al., 1989; CHUMPITAZI et al., 1995; BESSIÈRES et al., 2001). No entanto, as sensibilidades para detecção de IgM e IgA não excederam a 67,5% e 72,5%, respectivamente. De modo geral, o IgA-ISAGA apresentou uma sensibilidade superior ao IgM-ISAGA no diagnóstico pós-natal até 10 dias de vida em recém-nascido com infecção congênita pelo *T. gondii* (WALLON et al., 1999; FAURE et al., 1999; BESSIÈRES et al., 2001; PINON et al., 2001; GILBERT et al., 2007). A combinação da detecção de IgA e IgM demonstrou um aumento na taxa de diagnóstico de recém-nascidos infectados (NAESSENS et al., 1999; PINON et al., 2001).

Devido às dificuldades encontradas na sorologia convencional, nos neonatos assintomáticos em que não sejam detectados IgM e/ou IgA, o diagnóstico confirmatório da infecção congênita é, usualmente, demorado até a observação da persistência de IgG ou aumento do título desse anticorpo. A diferenciação dos anticorpos IgG maternos daqueles anticorpos sintetizados pelos próprios recém-nascidos infectados, realizado pelo método de Western Blotting (WB), introduzido por Remington, Araujo e Desmonts (1985), pode ser uma alternativa adicional aos testes comumente utilizados no diagnóstico da toxoplasmose congênita. Por meio desses métodos, a comparação dos padrões de reatividade dos anticorpos IgG contra antígenos específicos do *T. gondii*, demonstra diferentes especificidades dos anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro da mãe e da criança, o que evidencia que a criança está sintetizando os seus próprios anticorpos IgG, confirmando assim que a mesma está infectada pelo *T. gondii*.

Chumpitazi e colaboradores (1995) analisaram o método de WB em comparação aos testes convencionais e concluíram que, ao nascimento, o método obteve uma sensibilidade de 92,6% com especificidade de 89,1%. Porém nos achados de Robert-Gangneux e colaboradores (1999) a sensibilidade da técnica foi menor de 88,2% mas com a especificidade de 100%. Em 2010, Machado e colaboradores relataram sensibilidade de 86,44% com especificidade de 94,74%. As diferenças observadas no desempenho entre os diferentes estudos podem ser justificadas pelas diferenças metodológicas entre os laboratórios (PINON et al., 2001; MACHADO et al. 2010).

O teste de WB pode ser uma ferramenta útil para a definição do diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita diferenciando os anticorpos maternos dos recém-nascidos porém, não é amplamente utilizado devido às desvantagens de sua complexidade e alto custo (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

No intuito de auxiliar o diagnóstico da toxoplasmose em crianças com risco de infecção congênita, as técnicas imunoenzimáticas têm sido modificadas, utilizando diferentes antígenos recombinantes do *T. gondii*, na tentativa de aprimorar os ensaios para a detecção de anticorpos específicos (BUFFOLANO et al., 2005). Neste sentido, vários estudos têm sido realizados na busca de novos antígenos que possam ser utilizados no diagnóstico sorológico da toxoplasmose.

Segundo Hegab e Al-Mutawa (2003), o *T. gondii* pode expressar diferentes antígenos dependendo do seu genótipo. A maioria dos estudos utilizou moléculas de *T. gondii* pertencentes a quatro grandes famílias de proteínas: os antígenos de superfície, membros da família SAG, que incluem o antígeno p30 (SAG1), reconhecido como o principal e mais abundante antígeno de superfície; antígenos secretados dos grânulos densos (GRAS), antígenos roptrias (ROPs) e as proteínas de micronema (MIC), que são responsáveis pelo processo de adesão e invasão de todos parasitos aplicomplexos (KASPER; CURRIE; BRADLEY, 1985; BURG et al., 1988; SOLDATI; DUBREMETZ; LEBRUN, 2001; BEGHETTO et al., 2005). Estudos relatam que os anticorpos podem ter reatividades distintas a diferentes antígenos

---

recombinantes, por isso recomendam o uso de uma combinação desses antígenos (BUFFOLANO et al., 2005; BEGHETTO et al., 2006).

Estudos anteriores demonstraram que os antígenos recombinantes podem melhorar o diagnóstico sorológico da infecção do *T. gondii* em adultos com infecção adquirida. Em 2005, Buffolano e colaboradores propuseram a utilização de ensaios baseados em antígenos recombinantes para detectar anticorpos específicos de *T. gondii* para o diagnóstico da infecção congênita em recém-nascidos. Neste estudo, a imunoreatividade contra epítomos dos fragmentos dos produtos dos genes MIC2, MIC3, MIC4, M2AP, AMA1 e SAG1 do *T. gondii* foram avaliados por meio da realização de imunoenaios enzimáticos com antígenos recombinantes (Rec-ELISA). Os ensaios de IgM-Rec-ELISA com antígenos recombinantes demonstraram um bom desempenho, com 97% de positividade em crianças com toxoplasmose congênita. Entretanto, alguns resultados falso positivos ocorreram provavelmente devido a reações inespecíficas de anticorpos IgM do soro das crianças não infectadas com o antígeno SAG1.

Neste contexto, Souza-e-Silva e colaboradores (2012) compararam anticorpos IgG e subclasses de IgG contra antígenos totais solúveis (STA) e recombinantes (SAG1 e MIC3) do *T. gondii* no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita. No geral, demonstrou-se uma alta sensibilidade de IgG total e IgG1 tanto para os antígenos solúveis quanto para os recombinantes, variando entre 86 a 99%. Entretanto, foi verificado uma baixa especificidade variando de 7 a 69%, indicando que o teste não foi acuradamente capaz de diferenciar as crianças não infectadas. Embora para as subclasses de anticorpos IgG3 e IgG4 o teste apresentou uma alta especificidade, o método apresentou baixa sensibilidade, não sendo capaz de identificar as crianças infectadas.

Outra técnica que tem sido alvo de estudos para o auxílio no diagnóstico da toxoplasmose congênita é a avidéz de IgG. O teste baseia-se na propriedade de maturação da afinidade funcional da reação antígeno-anticorpo que é proporcional ao tempo de infecção. A avidéz com que os anticorpos IgG ligam-se ao seus antígenos pode ser avaliada pela maior ou menor facilidade de dissociação desta ligação com substâncias desnaturantes (uréia 6M). Ainda pouco se sabe sobre o

valor diagnóstico da medição de avidéz de IgG nesta doença (BUFFOLANO et al., 2004). Entretanto, atualmente, alguns autores tem se empenhado na determinação da avidéz de IgG na identificação de recém-nascidos com toxoplasmose congênita (SAID; ZAKI; ABDELRAZIK, 2011; TORRES et al., 2013).

Embora vários estudos ao longo destes anos têm sido realizados no sentido de desenvolver testes sorológicos capazes de identificar os neonatos com toxoplasmose congênita, dificuldades existentes no diagnóstico sorológico pós-natal continuam a ser um problema em nosso meio. Visto que, usualmente, o diagnóstico neonatal é realizado por meio da detecção de anticorpos específicos IgM ou IgA e em um número significativo de recém-nascidos infectados, esses anticorpos estão ausentes ou são produzidos em concentrações abaixo dos níveis detectáveis para a maioria dos testes disponíveis, ainda se faz necessário alternativas para melhorar o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.

Diante disso, atualmente, o padrão ouro no diagnóstico da toxoplasmose congênita para neonatos negativos para anticorpos IgM/IgA anti-*T. gondii* é a avaliação da persistência ou do aumento de IgG anti-*T. gondii* nas crianças durante o primeiro ano de vida, demonstrando que estes anticorpos estão sendo produzidos pelas crianças. Contudo, esse método é demorado e o tratamento precoce das crianças infectadas é de suma importância.

O diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita logo após o nascimento é importante, pois possibilita a instituição rápida da terapia, que deverá evitar o aparecimento de sequelas em crianças sem sintomas e melhorar a qualidade de vida dos recém-nascidos sintomáticos (NAESSENS et al., 1999).

Na procura por testes eficazes para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, uma nova metodologia baseada na técnica da imunofluorescência indireta por citometria de fluxo tem se mostrado promissora. Em 2009, Barros avaliou pela primeira vez a técnica de citometria de fluxo para detecção da avidéz de IgG, subclasses de IgG e IgM anti-*T. gondii* no diagnóstico sorológico das fases aguda e convalescente tardia da toxoplasmose humana sintomática, trazendo novas perspectivas no estudo do diagnóstico da doença. Recentemente, nosso grupo

também avaliou a citometria de fluxo como ferramenta metodológica na detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, e demonstrou por meio do desempenho do método uma nova abordagem sorológica para o diagnóstico da toxoplasmose aguda humana, com objetivo de diferenciar toxoplasmose recente da crônica, que se mostrou um método alternativo efetivo (SILVA-DOS-SANTOS et al., 2012).

Portanto, considerando esses achados e com o intuito de contribuir com o avanço do diagnóstico da toxoplasmose congênita, o objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho do ensaio de imunofluorescência indireta baseada em citometria de fluxo na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em recém-nascidos infectados congenitamente e sua utilização como uma ferramenta complementar para o diagnóstico sorológico pós-natal precoce da toxoplasmose congênita.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii*, por citometria de fluxo, no diagnóstico sorológico pós-natal precoce da toxoplasmose congênita.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estabelecer os critérios de interpretação da pesquisa de anticorpos IgM, IgA, IgG, subclasses de IgG e avidéz de IgG anti-*T.gondii*, por citometria de fluxo, no diagnóstico da toxoplasmose congênita;
2. Avaliar o desempenho da pesquisa de anticorpos IgM, IgA, IgG, subclasses de IgG e avidéz de IgG anti-*T.gondii*, por citometria de fluxo, no diagnóstico da toxoplasmose congênita;
3. Comparar a sorologia das mães com suas respectivas crianças e avaliar se a diferença na reatividade de anticorpos pode ser utilizada como ferramenta para o diagnóstico da infecção congênita pelo *T. gondii*;
4. Propor um algoritmo para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita utilizando a citometria de fluxo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

As amostras de soro das crianças avaliadas neste estudo foram obtidas a partir de um estudo sobre o impacto da toxoplasmose congênita em Minas Gerais, realizado no período de 01 de Novembro de 2006 a 31 de maio de 2007 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), parecer nº 0298/06.

#### 3.2 AMOSTRAS DE SORO

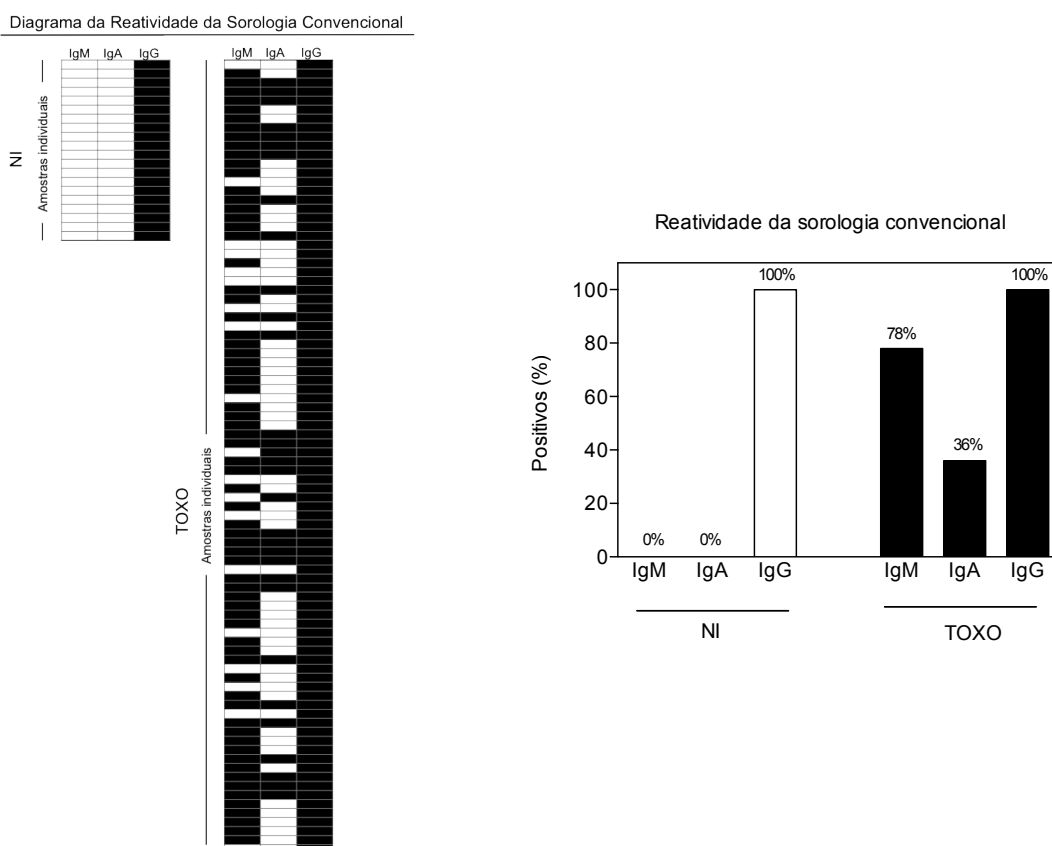
O estudo foi desenvolvido com crianças participantes do Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN) de Minas Gerais. Inicialmente foram realizados testes em eluatos de sangue seco em papel filtro para pesquisa de IgM anti-*T. gondii* (TOXO IgM Q-Preven<sup>®</sup>, Symbiosis, Leme, Brasil) nos recém-nascidos participantes do PETN, colhidos nos primeiros dias de vida para a realização também da triagem de doenças metabólicas e genéticas (Teste do Pezinho). Para aqueles que apresentaram sorologia positiva ou indeterminada, foram coletadas amostras do sangue periférico das crianças e de suas respectivas mães, em média entre 30 a 45 dias após a triagem neonatal, para testes confirmatórios. Após centrifugação do sangue, o soro foi aliquoteado e congelado a -20°C até a realização dos novos testes. As amostras de soro das crianças e das mães foram submetidas, ao ensaio fluorimétrico ligado a enzima para pesquisa de IgM, IgA e IgG para confirmar o diagnóstico (ELFAVIDAS<sup>®</sup>, BioMérieux SA, Lyon, França). Após 12 meses foi realizada nova coleta de sangue periférico das crianças, com o intuito de confirmar o diagnóstico pela persistência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, metodologia que é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da toxoplasmose congênita. De acordo com os resultados obtidos nesses ensaios, um total de 107 amostras de soro foram classificadas em dois grupos:

Grupo I - Crianças não infectadas (NI): 19 crianças que apresentaram resultado negativo para anticorpos IgG anti-*T. gondii* ao final de 12 meses.

Grupo II – Crianças infectadas (TOXO): 88 crianças com persistência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* ao final de 12 meses.

### 3.3 ANÁLISE DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS ANTI-*T. gondii* DETECTADOS PELO ENSAIO FLUORIMÉTRICO LIGADO A ENZIMA (ELFA), EM SOROS DE CRIANÇAS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E DE CRIANÇAS NÃO INFECTADAS

Das 88 crianças do grupo de toxoplasmose congênita (TOXO) que realizaram sorologia pelo método convencional (ELFA), em média entre 30 a 45 dias após a triagem neonatal, 78% apresentaram IgM reagente, 36% apresentaram IgA reagente e 100% das crianças apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Das 19 crianças não infectadas (NI), nenhuma delas apresentaram IgM ou IgA positivo, em contrapartida, 100% apresentaram anticorpos IgG anti-*T.gondii* (Figura 4).



**Figura 2** – (A) Diagrama com os resultados positivos (■) e negativos (□) para a pesquisa de anticorpos IgM, IgA e IgG em soros individuais de crianças com toxoplasmose congênita (TOXO) e de crianças não infectadas (NI). (B) Porcentagem de resultados positivos do grupo NI e TOXO utilizando o método ELFA para o diagnóstico de toxoplasmose congênita.

### 3.4 OBTENÇÃO E PREPARO DAS FORMAS TAQUIZOÍTAS DE *T. gondii* PARA OS ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Balb/C de 9 a 11 semanas de idade, por passagens sucessivas a intervalos de 48 a 72 horas de um inóculo de aproximadamente  $10^6$  taquizoítos, obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados. Os exsudatos peritoneais foram obtidos por meio de lavagem da cavidade abdominal do animal com solução salina estéril tamponada com fosfato a 0,01M (pH 7,2). As suspensões parasitárias coletadas foram submetidas a uma centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remoção de fragmentos celulares do hospedeiro. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C) com PBS (*Phosphate Buffered Saline*), descartado e o sedimento final foi tratado 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 por 24 horas (MARTINS-FILHO et. al., 1995). Após esse período, os parasitos fixados foram centrifugados a 1.000 x g, 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de PBS. Posteriormente, foi realizado a contagem do número dos parasitos em câmara de Neubauer e a suspensão celular foi ajustada para  $5 \times 10^6$  taquizoítos/mL para utilização nos ensaios de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo.

### 3.5 PESQUISA DE ANTICORPOS IgM, IgA, IgG E SUBCLASSES DE IgG ANTI-TAQUIZOÍTAS FIXADAS DE *T. gondii* E AVIDEZ DE ANTICORPOS IgG POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo para o estudo de anticorpos IgM, IgA, IgG, subclasses de IgG anti-taquizoítos fixados de *T. gondii* foram realizados segundo o protocolo descrito por Silva-dos-Santos e colaboradores (2012) com modificações. O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços com fundo em “U” (Nunc<sup>®</sup>, Dinamarca), onde adicionou-se uma alíquota de 50 µL do soro previamente diluído em PBS- 3% SFB (Soro Fetal Bovino), juntamente com 50 µL da suspensão de parasitos ( $5,0 \times 10^6$ /mL) e incubados a 37°C durante 30 minutos.

Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS- 3% SFB, por centrifugação a 1.000g, 4°C durante 10 minutos, e o sobrenadante desprezado.

Para a pesquisa de anticorpos IgM, IgA e IgG, posteriormente, os parasitos foram incubados com 50 µL de anticorpos secundários anti-IgM, anti-IgA e anti-IgG humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Chemical Corp.®, St.Luis, MO), diluídos 1:2.000 para IgM, 1:1.000 para IgA e 1:20.000 para IgG em PBS- 3% SFB, a 37°C durante 30 minutos ao abrigo da luz.

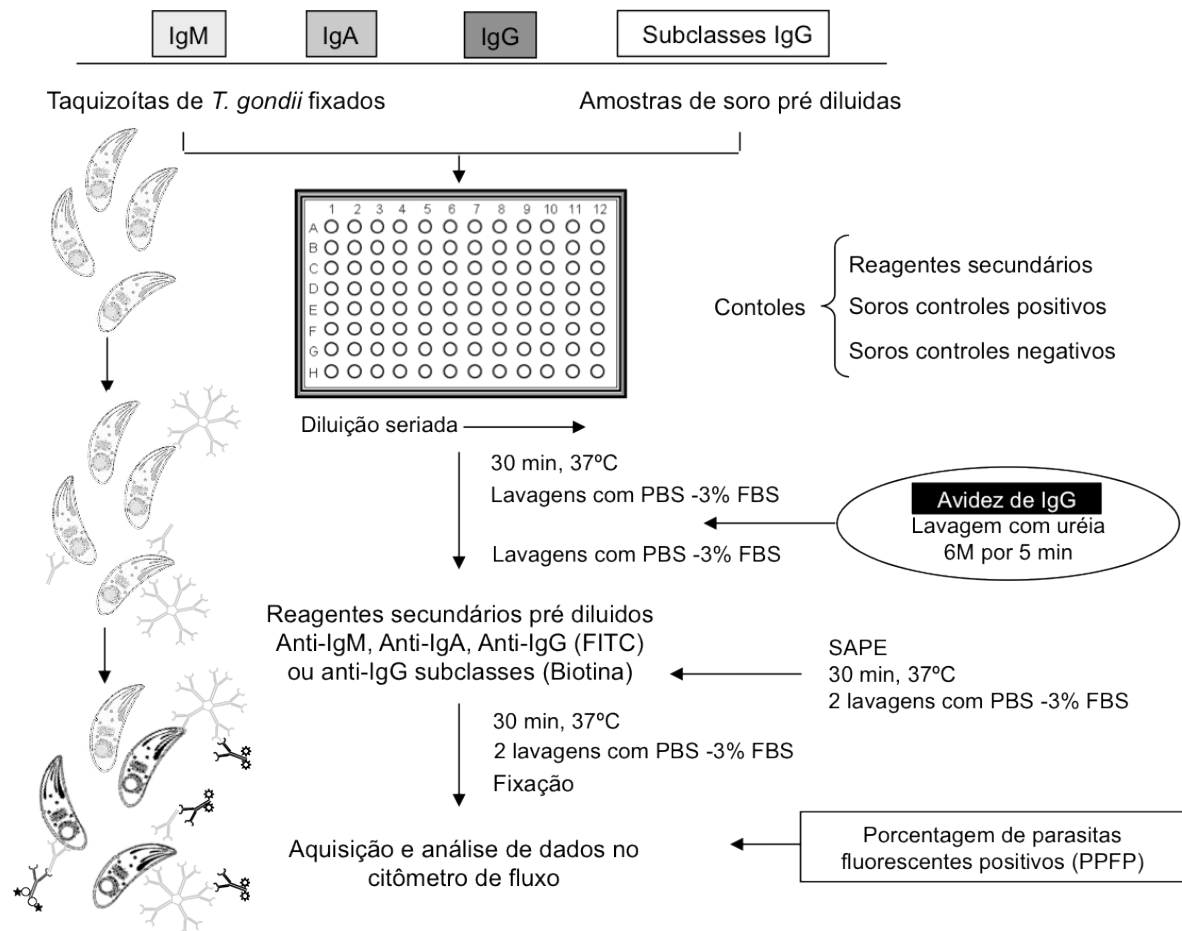
Para a pesquisa de subclasses de IgG, os parasitos foram incubados com 50 µL de anticorpos secundários anti-subclasses de IgG humano marcados com biotina (Sigma Chemical Corp.®, St.Luis, MO), diluídos 1:20.000 para IgG1, 1:1.000 para IgG2 e IgG4 e 1:2.000 para IgG3 em PBS- 3% SFB, a 37°C durante 30 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS- 3% SFB e o sobrenadante desprezado. Na etapa seguinte, os parasitos foram incubados com 20 µL de estreptoavidina conjugado com ficoeritrina (SAPE) (Sigma Chemical Corp.®, St.Luis, MO), diluído 1:400 em PBS- 3% SFB e incubados a 37°C durante 30 minutos ao abrigo da luz.

Após a incubação com os anticorpos secundários, os parasitos foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS- 3% SFB e ressuspensos em 200 µL de solução fixadora para citometria. As amostras foram mantidas no mínimo por 30 minutos e no máximo por 24 horas, a 4°C, ao abrigo de luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScan-Becton Dickinson®, San Jose, CA, EUA). Os dados coletados foram armazenados e analisados posteriormente.

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

O ensaio de avidéz de IgG por citometria de fluxo foi realizado conforme descrito anteriormente para o ensaio de IgG com algumas modificações. O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços com fundo em “U” (Nunc<sup>®</sup>, Dinamarca), em duas placas adicionou-se 50 µL do soro previamente diluído, juntamente com 50 µL da suspensão de parasitos (5,0x10<sup>6</sup>/mL) e incubados a 37°C por 30 minutos. Os parasitos foram lavados uma vez com 200 µL PBS- 3% SFB por centrifugação a 1.000 x g, 4°C durante 10 minutos. Posteriormente, 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 em seguida, submetidas à centrifugação a 1.000 x g, 4°C durante 10 minutos, e o sobrenadante desprezado. Após nova lavagem com 200 µL PBS-3% SFB, a reação foi revelada como descrito no ensaio de citometria para pesquisa de anticorpos IgG.

Os resultados foram expressos em Índice de Avidéz (IA) e calculado como a razão entre os valores de PFP obtidos das amostras tratadas com uréia (U<sup>+</sup>) e as amostras não tratadas (U<sup>-</sup>), segundo a fórmula:  $IA (\%) = [PFP(U^+) / PFP (U^-)] \times 100$ . Para a determinação do índice de avidéz foi utilizada a última diluição do soro que apresentava valores de PFP superiores a 30% na curva de titulação de IgG sem tratamento com uréia.



**Figura 3** - Desenho do esquema experimental para a pesquisa de anticorpos anti-taquizoítos fixados de *T. gondii* por citometria de fluxo

A tabela 1 mostra a relação dos anticorpos secundários, sua procedência, diluições nos ensaios e diluições dos soros dos pacientes.

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

Anticorpo	Diluição	Marcação	Origem	Diluição do soro
AcM. Anti IgM	1:2.000	FITC	Cabra	1:4.000-1:128.000
AcM Anti IgA	1:1.000	FITC	Cabra	1:250-1:16.000
AcP. Anti IgG	1:20.000	FITC	Cabra	1:32.000-1:2.048.000
AcM. Anti IgG1	1:20.000	Biotina*	Camundongo	1:32.000-1:2.048.000
AcM. Anti IgG2	1:1.000	Biotina*	Camundongo	1:250-1:16.000
AcM. Anti IgG3	1:2.000	Biotina*	Camundongo	1:1.000-1:64.000
AcM. Anti IgG4	1:1.000	Biotina*	Camundongo	1:500-1:32.000

AcM. = anticorpo monoclonal; AcP. = anticorpo policlonal; FITC = isotiocianato de fluoresceína  
 \*AcM. biotinilados foram posteriormente incubados com estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE) para detecção.

### 3.6 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO

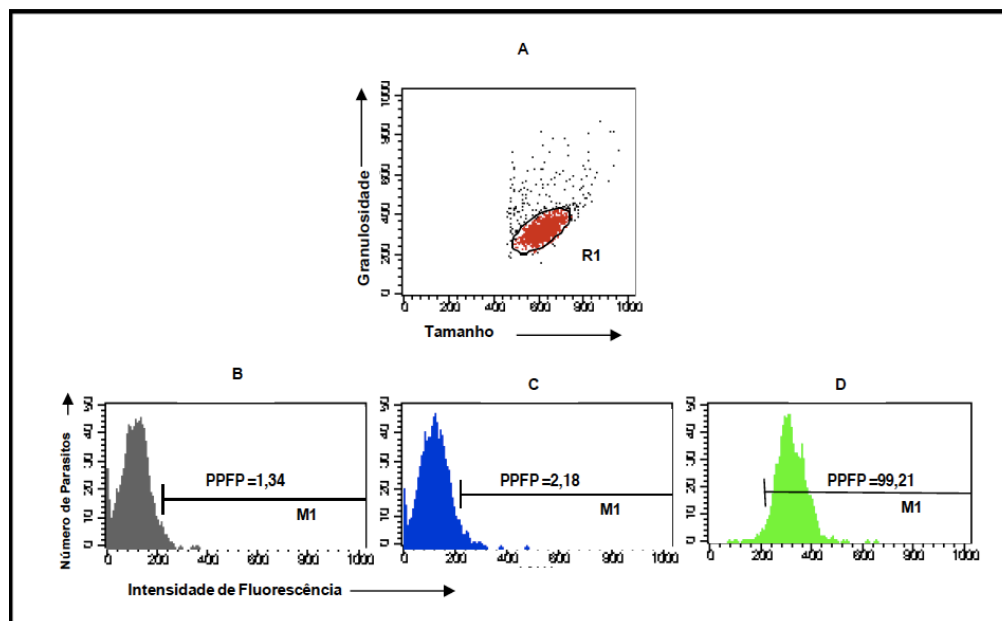
A citometria de fluxo é um método que utiliza um sistema óptico eletrônico, que avalia a emissão de fluorescência, bem como a dispersão de raios *laser* incidentes sobre uma célula desta forma, permite a análise de três parâmetros celulares: tamanho (FSC-Forward Scatter), granulosidade ou complexidade interna (SSC-Side Scatter) e a emissão de fluorescência.

A aquisição e 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. Nesse estudo foram empregados anticorpos marcados com FITC que, quando excitados emitem sinais luminosos correspondentes às fluorescências do tipo 1 (FL1-fluorescência verde) e anticorpos marcados pelo sistema biotina/SAPE que, quando excitados emitem sinais luminosos correspondentes às fluorescências do tipo 2 (FL2-fluorescência laranja).

A figura 3 mostra a distribuição característica e homogênea dos taquizoítos apresentados 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.

Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos, após incubação com soros de crianças infectadas e não infectadas e o reagente fluorocromo, foram expressos sob a forma de PFP. Para cada experimento, foi estabelecido um limiar de positividade de no máximo 2% de PFP, em função de curva de fluorescência do tubo controle sem soro, de ligações inespecíficas do anticorpo secundário (M1, Figura 3B). Em seguida, o mesmo marcador, foi empregado para obtenção dos valores de PFP para cada amostra individual (Figura 3 C e D).





**Figura 4** - Sequência de análise de anticorpos anti-taquizoítos 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 (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.

### 3.7 ANÁLISE DO DESEMPENHO DO MÉTODO PARA O DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Para a obtenção dos valores de sensibilidade e especificidade para o método de diagnóstico avaliado foi necessário a definição de um ponto de corte, ou seja, um valor que permitisse classificar os resultados do teste como positivos e negativos. Para cada ponto de corte estabelecido foram obtidos valores de sensibilidade e especificidade correspondentes. A definição do ponto de corte foi feita levando-se em conta os propósitos do teste e as implicações dos resultados errôneos, falso positivos e falso negativos. Portanto, dentre os diversos critérios para a definição de um ponto de corte, no nosso estudo foi selecionado aquele que o teste obtivesse o maior valor possível de especificidade.

Para os ensaios de citometria de fluxo, a ferramenta estatística utilizada para determinar o ponto de corte, bem como os índices de sensibilidade e especificidade relativas e os respectivos intervalos de confiança a 95% dos testes, foi a *Two-graph*

*receiver operating characteristic* (TG-ROC), proposta por Greiner, Sohr e Göbel (1995), sendo uma modificação da análise da curva ROC convencional.

Com utilização do programa estatístico GraphPad Prism 5.0 os dados foram analisados utilizando TG-ROC que é representado por dois gráficos em eixos opostos, um representando a sensibilidade e o outro representando a especificidade do teste avaliado, no eixo Y, em diferentes pontos de corte, que variam ao longo do eixo X do gráfico. Assim, a TG-ROC possibilita a visualização de uma ampla faixa de valores de ponto de corte com as respectivas sensibilidade e especificidade obtidas para cada um deles. Em contraste com a análise da curva ROC convencional, onde os diferentes pontos de corte não podem ser visualizados diretamente no gráfico com os respectivos valores de sensibilidade e especificidade (GREINER; SOHR; GÖBEL, 1995; GREINER, 1995).

Outra forma de abordagem do desempenho de testes de diagnóstico, consiste na determinação das razões de verossimilhança (RV). A RV para um determinado resultado do teste diagnóstico é expressa em chance e é definida pela razão entre proporção de um referido resultado em crianças com toxoplasmose congênita em relação à proporção do mesmo resultado em crianças sem a doença. As RVs para um resultado positivo e negativo dos testes de diagnóstico foram determinadas, respectivamente, pelas relações:

$$RV+ = \frac{\text{Sensibilidade}}{1 - \text{Especificidade}}$$

$$RV- = \frac{1 - \text{Sensibilidade}}{\text{Especificidade}}$$

Em seguida, calculou-se o valor preditivo positivo (VP+) e o valor preditivo negativo (VP-), baseado nas seguintes fórmulas:

$$VP + = \frac{\text{Verdadeiros positivos}}{\text{Verdadeiros positivos} + \text{Falsos positivos}}$$

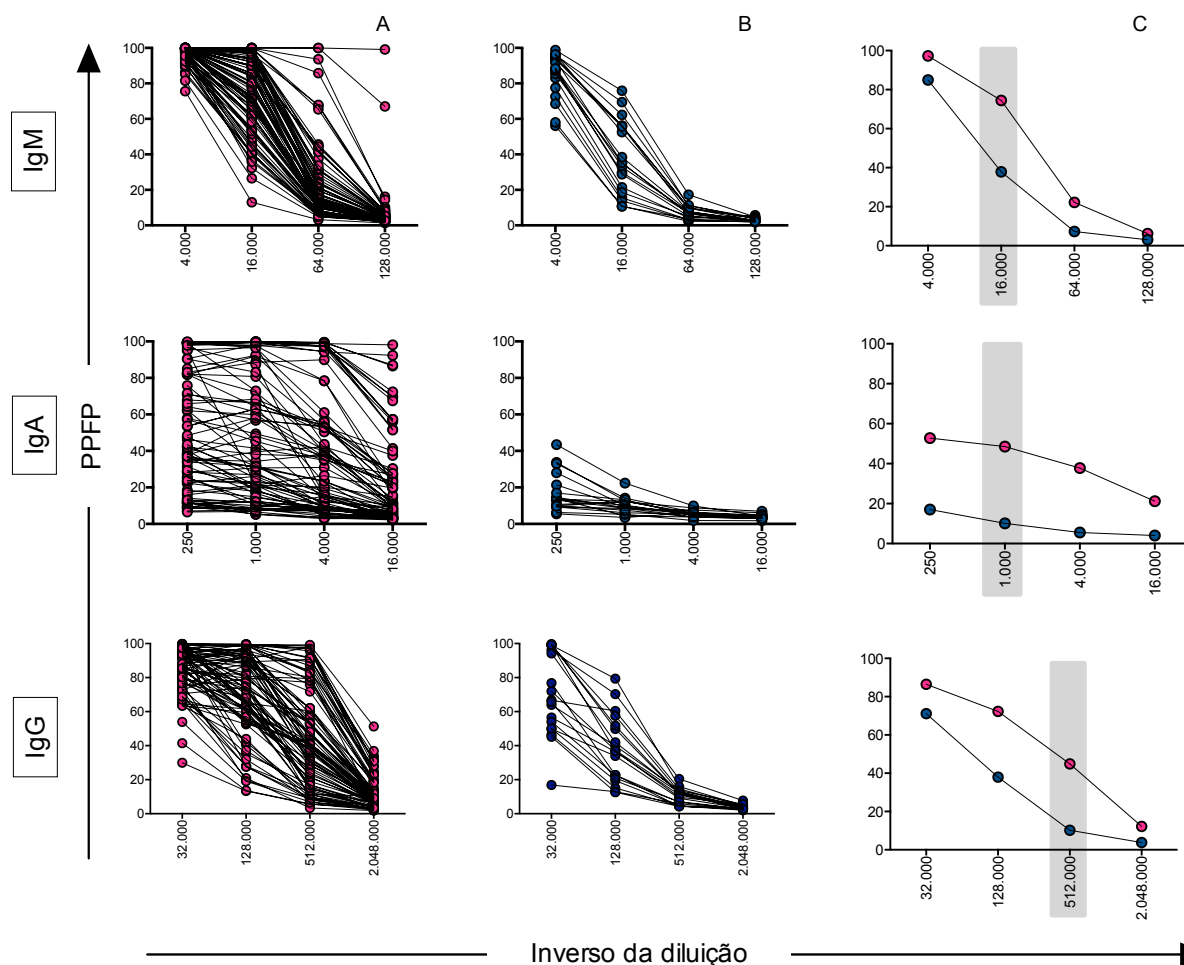
$$VP - = \frac{\text{Verdadeiros negativos}}{\text{Verdadeiros negativos} + \text{Falsos negativos}}$$

## 4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE IgM, IgA E IgG ANTI-*T. gondii*, DETECTADOS PELA CITOMETRIA DE FLUXO, EM SOROS DE CRIANÇAS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E DE CRIANÇAS NÃO INFECTADAS E SUA APLICABILIDADE NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

### 4.1.1 Determinação da diluição do soro para a pesquisa de anticorpos IgM, IgA e IgG anti-*T. gondii* em soros de crianças com toxoplasmose congênita e de crianças não infectadas

A partir das curvas de titulação dos anticorpos, em soros individuais de crianças do grupo TOXO e do grupo NI, mostrados na figura 5 (A) e (B), foi traçado uma curva de reatividade média, para cada grupo avaliado. A Figura 5 (C) mostra uma amplitude de segregação pouco pronunciada entre as curvas de reatividade média dos grupos avaliados para os anticorpos IgM, IgA e IgG. No entanto, foi demonstrado que na diluição do soro 1:16.000 para IgM, 1:1.000 para IgA e 1:512.000 para IgG, houve uma maior amplitude de segregação entre a reatividade dos grupos analisados, sugerindo estas diluições como as mais apropriadas para melhor diferenciar os grupos TOXO e NI.



**Figura 5** – Curvas de titulação dos anticorpos IgM, IgA e IgG anti-*T. gondii* pela citometria de fluxo em soros individuais de crianças com toxoplasmose congênita (A) e não infectadas (B). O gráfico C representa as médias de reatividades dos grupos TOXO (●) e NI (●). Em cinza está destacada a diluição do soro que apresentou maior amplitude de segregação entre os grupos. Os resultados da reatividade dos anticorpos de cada grupo estão expressos em valores de PFP.

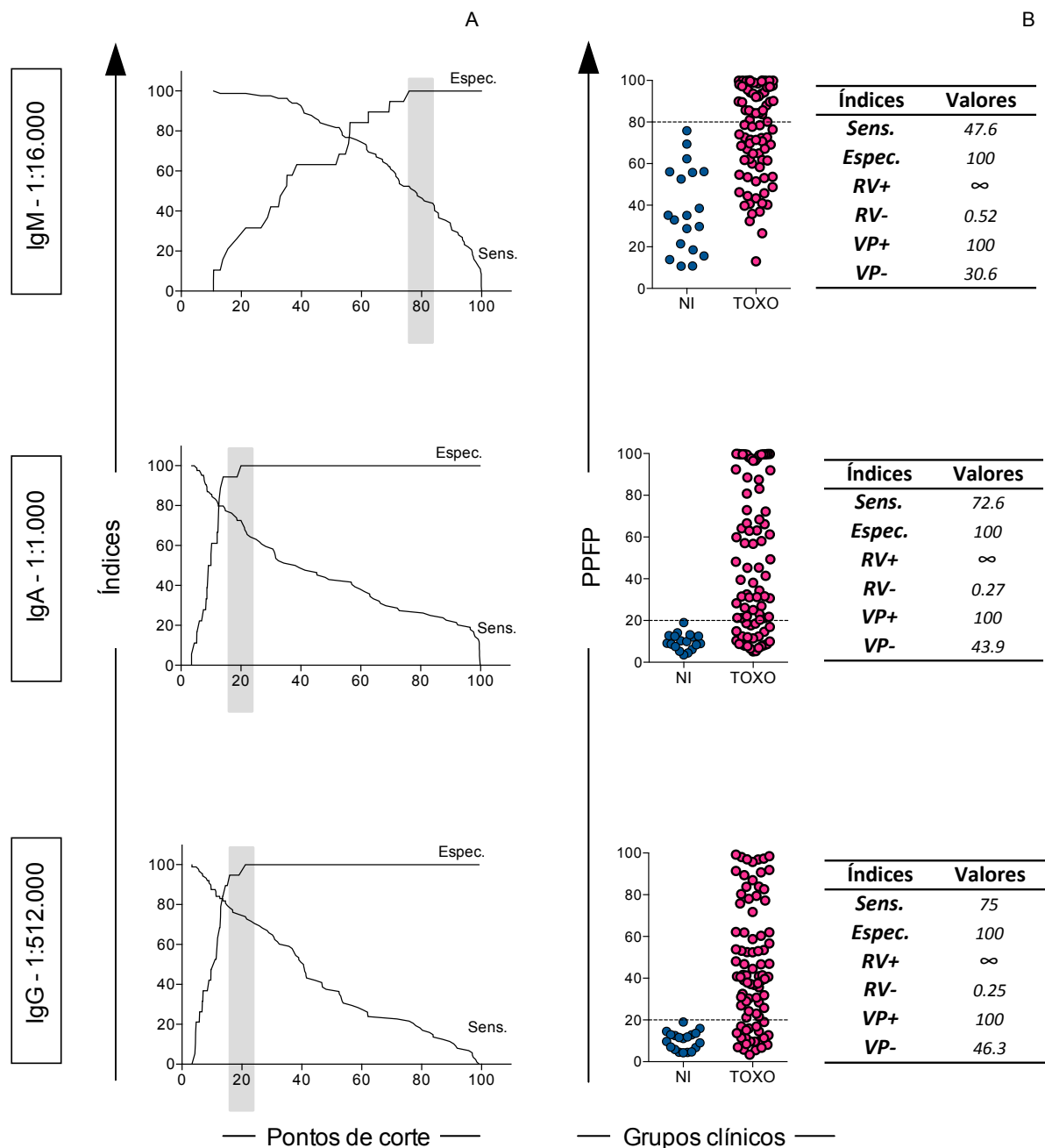
#### 4.1.2 Avaliação do desempenho da pesquisa de IgM, IgA e IgG anti-*T.gondii* no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita

Após escolhida a melhor diluição do soro que permitisse segregar os grupos, os valores de PFP das amostras individuais de crianças dos grupos TOXO e NI foram avaliados na diluição escolhida a fim de se construir a curva TG-ROC e calcular os índices de avaliação de desempenho dos testes. Dessa forma, a construção das curvas TG-ROC utilizando os dados obtidos nas diluições 1:16.000 para IgM, 1:1.000 para IgA e 1:512.000 para IgG estão representados na figura 6 (A).

Pode-se observar pelos gráficos das curvas TG-ROC que os pontos de corte escolhidos foram 80% para IgM e 20% para IgA e IgG, representados na figura 6 (A). A definição do ponto de corte foi baseada na escolha do PFP que fornecesse uma especificidade de 100%, ou seja, um ponto de corte que permitisse que todas as crianças não infectadas apresentassem reatividade negativa pelo método proposto. Portanto, utilizando os pontos de corte acima, os resultados mostraram que para a pesquisa de IgM a sensibilidade do teste foi de 47,6% (IC95%= 36,4-58,9) com especificidade de 100% (IC95%= 82,3-100). Foi observado que os índices de desempenho da pesquisa de IgA foram de 72,6% de sensibilidade (IC95%= 61,8-81,8) e especificidade 100% (IC95%= 81,47-100). Para a pesquisa de IgG os valores de sensibilidade e especificidade foram de 75% (IC95%=64,6-83,6) e 100% (IC95%= 82,3-100), respectivamente (Tabelas da figura 6B).

Para complementação dos índices de desempenho dos métodos, foram avaliados os valores preditivos positivos (VP+) e negativos (VP-) e as razões de verossimilhança positiva (RV+) e negativa (RV-). A citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos IgM, IgA e IgG apresentaram valor de predição positivo de 100%. O valor preditivo negativo para a pesquisa desses anticorpos foram de 30,6% para IgM, 43,9% para IgA e 46,3% para IgG (Tabelas da figura 6B).

A RV para o resultado positivo da pesquisa de IgM (PFP>80%) foi  $+\infty$  e para o resultado negativo (PFP≤80%) foi de 0,52. As RV para o resultado positivo da pesquisa de IgA e IgG (PFP>20%) foram de  $+\infty$  e para o resultado negativo (PFP≤20%) foram de 0,27 e 0,25 (Tabelas da figura 6B). Isso significa que a chance das crianças que apresentam um resultado positivo do teste é infinitamente maior de serem provenientes de crianças com toxoplasmose congênita do que de crianças não infectadas. Por outro lado, os resultados negativos do teste de IgM apresentam uma chance de 0,52, para IgA de 0,27 e para IgG de 0,25 de serem provenientes de crianças com toxoplasmose.



**Figura 6** – (A) Curva TG-ROC da pesquisa de IgM, IgA e IgG anti-*T.gondii* pela citometria de fluxo em soros de crianças com toxoplasmose congênita e crianças não infectadas. Em cinza está destacado a escolha do ponto de corte. (B) Perfil de dispersão individual dos soros dos grupos TOXO (●) e NI (●) da diluição candidata. A linha pontilhada refere-se ao ponto de corte selecionado pela curva TG-ROC. Tabela com os índices de desempenho dos testes. *Sens.*= Sensibilidade; *Espec.*= Especificidade; *RV*= Razão de Verossimilhança e *VP*= Valor Preditivo.

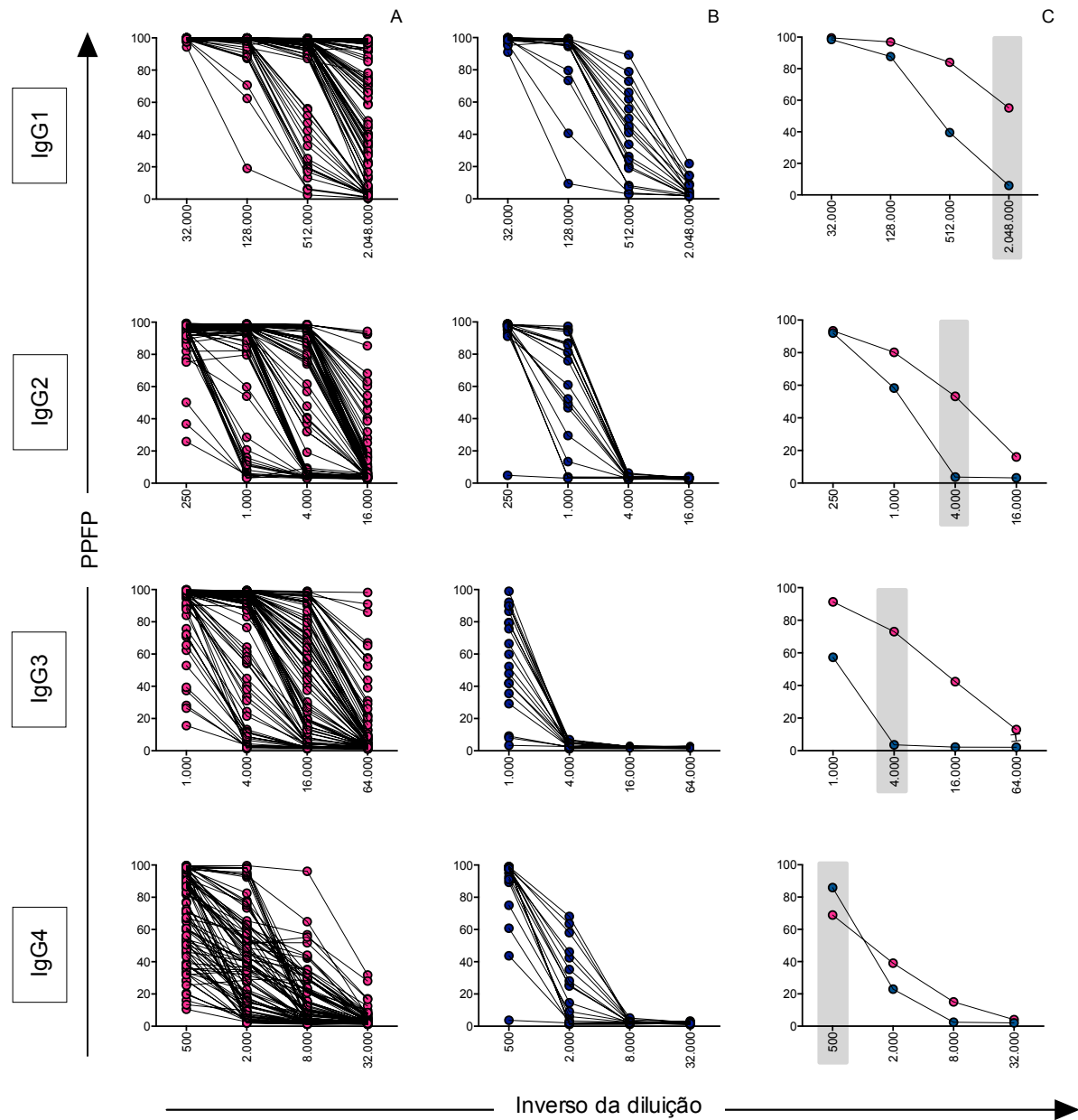
A próxima etapa do estudo foi avaliar a reatividade das subclasses de IgG na tentativa de buscar um melhor marcador que pudesse permitir o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.

#### 4.2 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE SUBCLASSES DE IgG ANTI-*T. gondii*, DETECTADOS PELA CITOMETRIA DE FLUXO, EM SOROS DE CRIANÇAS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E DE CRIANÇAS NÃO INFECTADAS E SUA APLICABILIDADE NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

##### **4.2.1 Determinação da diluição do soro para a pesquisa de subclasses de IgG anti-*T.gondii* em soros de crianças com toxoplasmose congênita e de crianças não infectadas**

A partir das curvas de titulação dos anticorpos, em soros individuais de crianças do grupo TOXO e do grupo NI, mostrados na figura 7 (A) e (B), foi traçado uma curva de reatividade média, para cada grupo avaliado. Por meio da análise das curvas de reatividades médias, pode-se verificar pela figura 7 (C) que, em relação a pesquisa de IgG1, IgG2 e IgG3, as diluições do soro que houve uma melhor amplitude de segregação da reatividade entre os grupos analisados foram 1:2.048.000 para IgG1 e 1:4.000 para IgG2 e IgG3, sugerindo estas diluições como as mais apropriadas para melhor diferenciar os grupos avaliados. Para o anticorpo IgG4, não foi possível segregar os grupos TOXO e NI. Entretanto, avaliou-se o desempenho do teste na diluição do soro 1:500.





**Figura 7** – Curvas de titulação das subclasses de IgG anti-*T. gondii* pela citometria de fluxo em soros individuais de crianças com toxoplasmose congênita (A) e não infectadas (B). O gráfico C representa as médias de reatividades dos grupos TOXO (●) e NI (●). Em cinza está destacada a diluição do soro que apresentou maior amplitude de segregação entre os grupos. Os resultados da reatividade dos anticorpos de cada grupo estão expressos em valores de PPFP.

#### 4.2.2 Avaliação do desempenho da pesquisa de subclasses de IgG anti-*T.gondii* no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita

A partir das diluições escolhidas que melhor segregaram os grupos foram contruídas as curvas TG-ROC utilizando os dados obtidos nestas diluições representadas na Figura 8 (A). A definição do ponto de corte dos métodos basearam-se na mesma estratégia utilizada para a pesquisa de IgM, IgA e IgG anti-*T. gondii*, onde os valores de especificidade fossem de 100%. A análise da curva TG-ROC para a pesquisa de IgG1 anti-*T. gondii* demonstrou que, na diluição do soro 1:2.048.000 e no ponto de corte (PC) de 20% para a segregação dos grupos TOXO e NI, a sensibilidade foi de 73,9% (IC95%= 63,4-82,7) e a especificidade foi de 100% (IC95%= 82,35-100). Foi observado que os índice de desempenho na diluição 1:4.000 de IgG2 com PC de 20%, apresentaram valores de sensibilidade de 60,2% (IC95%= 49,2-70,5) e especificidade 100,0% (IC95%= 82,3-100), demonstrados nas tabelas da figura 8 (B).

Para a pesquisa de IgG3 anti-*T. gondii* pode-se verificar ótimos índices de desempenho na diluição do soro 1:4.000, apresentando valores de sensibilidade de 83% (IC95%=73,4-90,1) e especificidade de 100% (IC95%= 82,3-100).

O desempenho da pesquisa de IgG4 na diluição 1:500 e no PC de 20%, apresentou valores de sensibilidade e especificidade de 94,7% (IC95%=73,9-99,9) e 4,6% (IC95%= 1,3-11,4), respectivamente (Tabelas da Figura 8B).

Para complementação dos índices de desempenho dos métodos, foram avaliados os valores preditivos positivos (VP+) e negativos (VP-) e as razões de verossimilhança positivas (RV+) e negativas (RV-). A citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 apresentou valor preditivo positivo de 100%. O valor preditivo negativo para a pesquisa desses anticorpos foram de 45,2% para IgG1, 35,2% para IgG2 e 55,9% para IgG3. Em relação a pesquisa de IgG4, o valor de preditivo positivo foi de 17,8% e o negativo de 80% (Tabelas da figura 8B).

As análises das RV da pesquisa de IgG1, IgG2 e IgG3 apresentaram RV positivas tendendo ao infinito em resultados superiores a 20% de PFP e uma RV negativa de

0,26 para IgG1, 0,40 para IgG2 e 0,17 para IgG3 para resultados inferiores a 20%. Isso significa dizer que a chance de resultados positivos dos testes serem provenientes de crianças com toxoplasmose congênita é infinitamente maior que de crianças não infectadas. Ao contrário, os resultados negativos dos testes apresentam uma chance de apenas 0,26 (IgG1), 0,40 (IgG2) e 0,17 (IgG3) de serem provenientes de crianças com toxoplasmose, conforme nas tabelas da figura 8 (B).

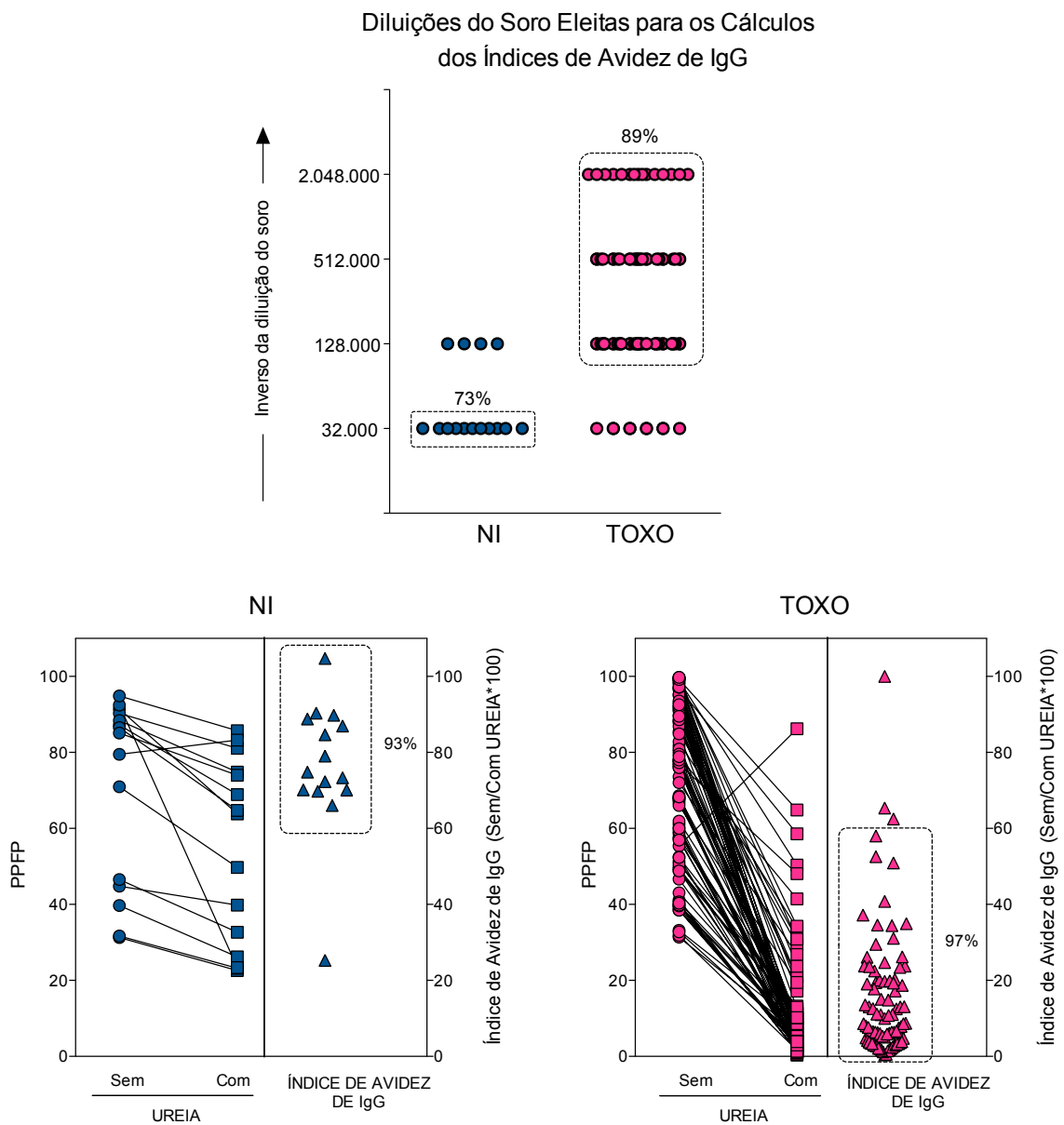
Por sua vez, a RV para o resultado positivo da pesquisa de IgG4 (PPFP>20%) foi de 1,01 e para o resultado negativo (PPFP≤20%) foi de 0,87 (Tabela da figura 8B).



### 4.3 AVALIAÇÃO DA AVIDEZ DE IgG ANTI-*T. gondii* E SUA APLICABILIDADE NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Com o objetivo de avaliar a determinação do índice de avidéz de IgG anti-*T. gondii* no soro de crianças com toxoplasmose congênita (TOXO) e não infectadas (NI) por citometria de fluxo, utilizou-se como critério o cálculo do índice de avidéz realizado na última diluição do soro com PFP superior a 30% na curva de titulação de IgG não tratado com uréia, como descrito por Silva-dos-Santos e colaboradores (2012). A figura 9 (Superior) mostra que diluições distintas foram selecionadas para cada amostra de soro, dependendo do perfil de reatividade. Para 73% das crianças não infectadas (NI) foram utilizadas a diluição do soro de 1:32.000 para a análise da avidéz de IgG, em contraste, diluições mais altas foram utilizadas em 89% das crianças com toxoplasmose congênita (TOXO) para determinação do índice de avidéz de IgG.

Para a segregação dos grupos TOXO e NI o ponto de corte do índice de avidéz utilizado foi de 60%, como descrito por Silva-dos-Santos e colaboradores (2012). A análise dos perfis de dispersão dos índices de avidéz para cada amostra individual representados na figura 9 (Inferior) demonstrou que 93% das crianças não infectadas apresentaram índices de avidéz superiores a 60%, ou seja, alta avidéz, ao passo que 97% das crianças com toxoplasmose congênita apresentaram índices de avidéz inferiores a 60%, ou seja, baixa avidéz. Dessa forma, os índices de desempenho do método de avidéz de IgG no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita foi de 97% de sensibilidade e 93% de especificidade.



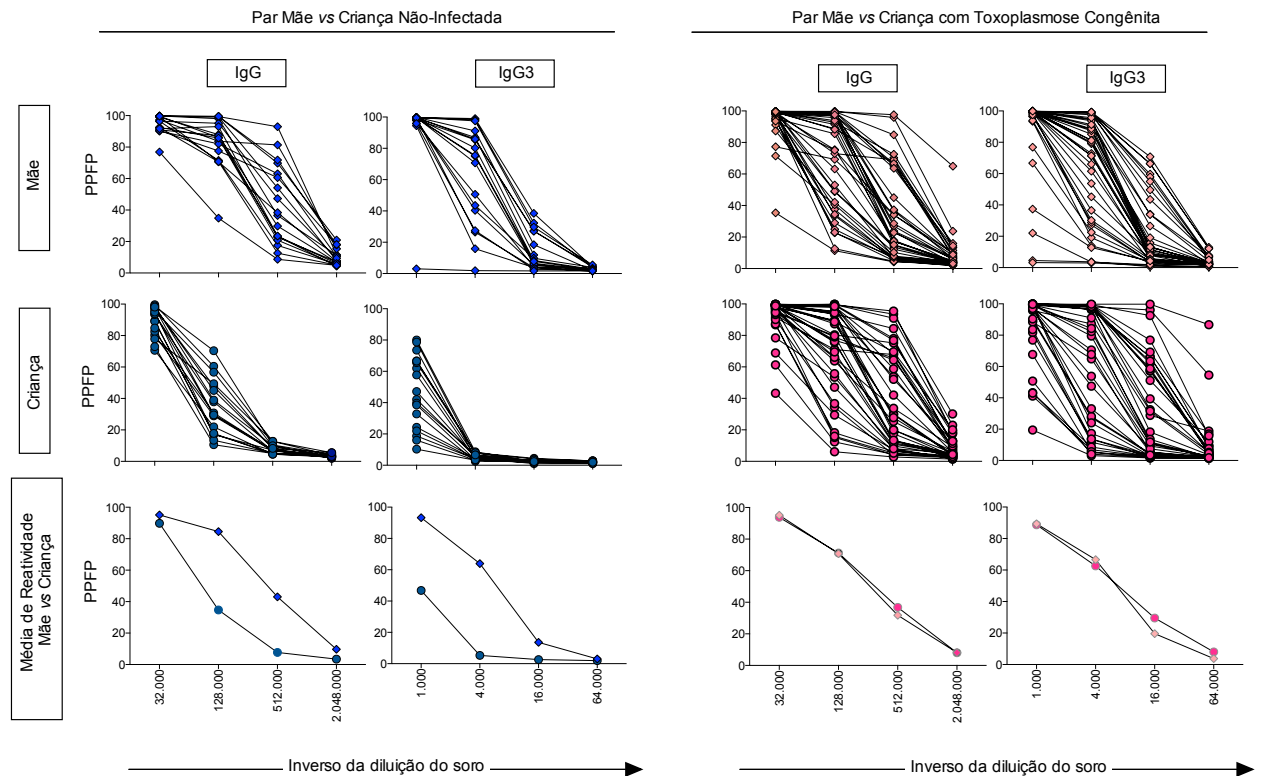
**Figura 9** – (Superior) Determinação das diluições do soro das amostras individuais do grupo TOXO (●) e NI (●) utilizadas no cálculo do índice de avidéz. (Inferior) Análise dos índices de avidéz dos grupos através do perfil de dispersão individual das amostras pela citometria de fluxo.

---

#### 4.4 COMPARAÇÃO DO PERFIL DE REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii* ENTRE AMOSTRAS PAREADAS DE MÃES E CRIANÇAS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA E CRIANÇAS NÃO INFECTADAS

Para análise comparativa do perfil de reatividade dos anticorpos IgG e IgG3, entre amostras de soro das crianças com toxoplasmose congênita e as não infectadas com suas respectivas mães, foi traçado uma curva de reatividade média, utilizando as curvas de titulação dos anticorpos em amostras de soros individuais dos grupos, representadas na figura 10. Esta análise se baseou na escolha do anticorpo IgG e IgG3 visto que, foi a subclasse de IgG que apresentou o melhor desempenho dos testes para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.

Pode-se verificar pelas reatividades médias que os títulos de anticorpos das crianças não infectadas foram menores do que das mães. Porém, ao se comparar as crianças com toxoplasmose congênita com suas respectivas mães foi observado títulos semelhantes desses anticorpos, sugerindo a produção endógena de anticorpos anti-*T. gondii* pela criança.



**Figura 10** – Comparação da reatividade média de crianças não infectadas (●) e suas respectivas mães (■) e crianças com toxoplasmose congênita (●) e suas respectivas mães (■) pela citometria de fluxo.

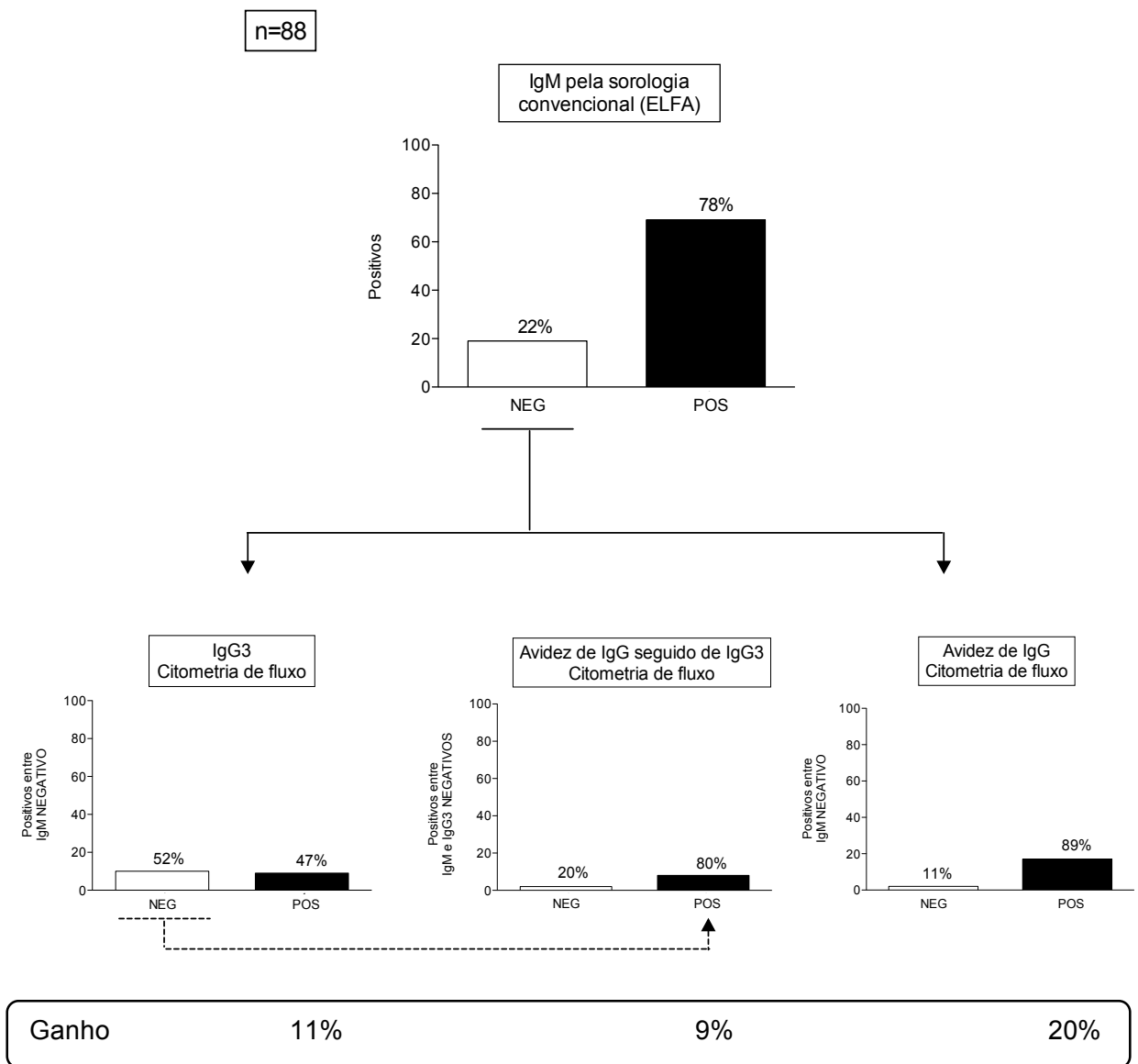
#### 4.5 PROPOSTA DE ALGORITMO PARA O DIAGNÓSTICO PRECOZE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Tendo em vista que o teste de IgM pelo método convencional é mais utilizado na rotina laboratorial, propomos neste estudo um algoritmo para o diagnóstico da toxoplasmose congênita utilizando-o como ensaio inicial seguido de IgG3 e avides de IgG ou seguido somente da avides de IgG pela citometria de fluxo para os casos negativos de IgM.

Aplicando o teste de IgM pelo método ELFA nas 88 amostras de soro das crianças com toxoplasmose congênita, 69 foram positivas (78%) e 19 amostras foram consideradas negativas (22%). Posteriormente, foram aplicados outros testes nas amostras de soro com resultado negativo, na tentativa de obter o diagnóstico. Das 19 amostras negativas, 9 foram positivas na pesquisa de IgG3 (11%) e 10 mostraram-se



negativas. Em seguida, das 10 amostras negativas para IgG3, 8 foram positivas para avidéz de IgG (9%) e 2 permaneceram negativas. Utilizando diretamente o ensaio de avidéz de IgG, 17 amostras foram positivas (20%) e 2 mostraram-se negativas. Portanto, o desempenho final obtido com a associação dos testes seria de 89% para IgM seguido de IgG3, 98% para IgM associado a IgG3 seguido de avidéz de IgG e 98% para IgM seguido diretamente de avidéz de IgG com uma especificidade de 93% para ambos os algoritmos.



**Figura 11** – Algoritmo para o diagnóstico da toxoplasmose congênita utilizando IgM pelo método ELFA

Desempenho final	89%	98%	98%
------------------	-----	-----	-----

como teste inicial, seguido da pesquisa de IgG3 e avidez de IgG ou seguido somente da avidez de IgG pela citometria de fluxo.

## 5. DISCUSSÃO

Considerando que as manifestações clínicas da infecção pelo *T. gondii* no recém-nascido estão frequentemente ausentes, a realização do diagnóstico laboratorial, principalmente os testes sorológicos, continuam sendo a principal abordagem para estabelecer o diagnóstico da toxoplasmose congênita pós-natal (PINON et al., 2001).

A utilização de métodos sorológicos, desde a reação de Sabin-Feldman em 1948 até as mais recentes técnicas, tem sido alvo de muitos estudos. No entanto, apesar de alguns deles apresentarem bom desempenho, nenhum tem apresentado alta sensibilidade e especificidade.

A necessidade de um teste altamente sensível e específico capaz de distinguir, logo após o nascimento, uma criança com toxoplasmose congênita de uma criança não infectada é essencial, o que permite o início rápido da terapia em crianças infectadas congenitamente pelo *T. gondii*, minimizando ou até mesmo evitando as sequelas provocadas pela infecção. Além disso, a exclusão das não infectadas é importante para evitar a instituição de um tratamento desnecessário, com consequentes danos para a saúde da criança, bem como a geração de custos dispensáveis para o sistema de saúde (NAESSENS et al., 1999; BUFFOLANO et al., 2005).

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose congênita é realizado usualmente por meio da detecção de anticorpos IgM e/ou IgA específicos em amostras de soro do neonato (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004). Entretanto, como cerca de apenas 76% dos bebês infectados apresentam estes anticorpos, na ausência destes, o diagnóstico pode se tornar problemático (BUFFOLANO et al., 2004; LEBECH et al., 1999; WALLON et al., 1999). Portanto, o que tem sido utilizado como padrão ouro no diagnóstico da toxoplasmose congênita em casos de IgM/IgA negativos, é a persistência de IgG após 12 meses de vida. Porém, este tempo de seguimento longo atrasa o diagnóstico definitivo e o retardo do início do tratamento que pode levar a complicações no quadro clínico da criança com toxoplasmose congênita.

Considerando que aproximadamente 30% das crianças infectadas congenitamente pelo *T. gondii* não são identificadas no período neonatal pelos atuais métodos

laboratoriais de rotina disponíveis, testes laboratoriais alternativos podem ser úteis na identificação precoce de crianças infectadas (NAESSENS et al., 1999; ROBERT-GANGNEUX et al., 1999; PETERSEN et al., 2007).

Diante do exposto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por citometria de fluxo, como uma alternativa para o diagnóstico da toxoplasmose congênita.

O uso da citometria de fluxo para analisar anticorpos anti-*T. gondii* fixados foi proposto pela primeira vez por Cozon e colaboradores (1993). Recentemente, nosso grupo introduziu a técnica com várias modificações e demonstrou um elevado desempenho do método no diagnóstico da toxoplasmose aguda humana (SILVA-DOS-SANTOS et al., 2012).

A técnica de citometria de fluxo representa uma nova estratégia para a análise da reatividade dos anticorpos, visto que emprega amostras de soro altamente diluídas comparadas àquelas usualmente utilizadas pelos métodos convencionais, com o objetivo de reduzir as reatividades interferentes indesejadas, sem que ocorra perda da sensibilidade do método diagnóstico.

Nossos resultados entretanto, mostraram que com relação a pesquisa de IgM, a citometria de fluxo não apresentou boa sensibilidade (47,6%) sendo menor do que o método convencional relatado na literatura que variou de 54% a 76,6% (FAURE et al., 1999; WALLON et al., 1999; ROBERT-GANGNEUX et al., 1999; PINON et al., 2001; GILBERT et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009). De fato, em nosso estudo o método convencional ELFA obteve um melhor desempenho em relação a citometria de fluxo com sensibilidade de 78%. Rodrigues e colaboradores (2009) também descreveram a baixa sensibilidade da detecção de IgM por diferentes técnicas, entre elas o método ELFA com 60,9% de sensibilidade. Entretanto, outros estudos relataram uma sensibilidade inferior ao obtido pela citometria de fluxo variando de 38,5% a 44,4% (CHUMPITAZI et al. 1995; NAESSENS et al., 1999; BISSIERES et al., 2001; AVELINO et al., 2014).

Mesmo com métodos sorológicos de alta sensibilidade, em recém-nascidos com toxoplasmose congênita podem não ser detectados anticorpos IgM ao nascimento (LAGO; OLIVEIRA; BENDER, 2014). De acordo com a literatura, dentre os fatores que podem influenciar a detecção laboratorial da presença de IgM no recém-nascido destaca-se a interferência da concentração de IgG materna, que atravessa a barreira placentária e compete com os sítios antigênicos. Além disso, a detecção de IgM no recém-nascido foi menor em casos que a soroconversão materna ocorreu no primeiro e segundo trimestre de gestação, provavelmente devido a produção de IgM já ter cessado ao nascimento (WALLON et al., 1999; ROBERT-GANGNEUX et al., 1999; BESSIERES et al., 2001; GILBERT et al., 2007; LAGO; OLIVEIRA; BENDER, 2014). Alguns estudos ainda relatam que é possível que o tratamento durante a gestação diminua a chance de detecção de IgM em neonatos com toxoplasmose congênita (COUVREUR et al., 1993; NAESSENS et al., 1999; PINON et al., 2001).

Em recente estudo, McLeod (2014) demonstrou que o teste para detecção de IgM anti-*T. gondii* é uma ferramenta útil, mas deve-se levar em conta, que mesmo quando utilizando métodos sorológicos com alta sensibilidade, até um terço dos neonatos com toxoplasmose congênita podem ser negativos para IgM no nascimento. Assim, a presença de IgM anti-*T. gondii* é importante, mas sua ausência não exclui a infecção congênita.

Com relação a pesquisa de IgA, a citometria de fluxo apresentou um melhor desempenho em relação à detecção de IgM, assim como descrito por alguns autores utilizando outras técnicas (NAESSENS et al., 1999; PINON et al., 2001; BESSIERES et al., 2001; GILBERT et al., 2007). Por meio da citometria de fluxo a sensibilidade de IgA foi de 72,6%, superior ao método ELFA, que em nosso estudo apresentou uma sensibilidade de 38%, assim como para outros métodos convencionais descritos na literatura (FAURE et al., 1999; WALLON et al., 1999; NAESSENS et al., 1999; BESSIERES et al., 2001; GILBERT et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009; AVELINO et al., 2014). Por outro lado, nosso resultado mostrou-se similar ao obtido por Pinon e colaboradores (2001) que demonstraram uma sensibilidade de 72,5% pelo método do ISAGA. Portanto, diante dos nossos resultados e de acordo com o descrito na literatura seria aconselhável a determinação simultânea de IgM e IgA no neonato,

uma vez que esta classe de imunoglobulina tem se mostrado um importante marcador de infecção congênita (BISSIERES et al., 1992; PINON et al., 2001). No entanto, os testes sorológicos para detecção de IgA são pouco disponíveis no Brasil (BRASIL, 2011).

A citometria de fluxo para a pesquisa dos anticorpos IgG apresentou um melhor desempenho em relação a detecção de IgM e foi semelhante ao desempenho do teste de IgA, com uma especificidade de 100% mas uma sensibilidade de 75%. Devido este isotipo possuir baixo peso molecular e ser capaz de ultrapassar a barreira placentária, e ser portanto transferido da mãe para o feto durante a gestação, nós empregamos a alternativa de utilizar amostras altamente diluídas do soro, 1:512.000 para IgG, de modo que o teste permitisse que todas as crianças não infectadas mas com IgG positivo no teste ELFA, apresentassem resultado negativo na citometria de fluxo. Assim, utilizando essa alternativa, 66 das 88 crianças infectadas apresentaram resultado positivo para IgG. Embora a sensibilidade da pesquisa de IgG seja de 75%, um resultado importante foi a exclusão de todas as crianças não infectadas, cujos soros apresentavam anticorpos IgG anti-*T.gondii* transferidos pela mãe.

Devido a baixa sensibilidade de IgG avaliou-se o desempenho da pesquisa de subclasses de IgG anti-*T. gondii* pela citometria de fluxo e sua utilidade no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita. Vale ressaltar que poucos estudos avaliaram a pesquisa de subclasses de IgG no diagnóstico da toxoplasmose congênita.

Nossos resultados mostraram que das quatro subclasses de imunoglobulina, a IgG1 foi a subclasse encontrada em maior nível no soro das crianças infectadas e não infectadas congenitamente, corroborando os dados da literatura que relatam que IgG1 é a subclasse que predominantemente é transferida da mãe para o feto (SIMISTER, 2003; BUFFOLANO et al., 2005; CAÑEDO-SOLARES et al., 2008; SOUZA-E-SILVA et al., 2012). Assim, em nosso estudo, foi necessário utilizar altas diluições de 1:2.048.000 do soro das crianças para conseguir segregar os grupos TOXO e NI. Embora a especificidade da pesquisa de IgG1 seja de 100%, com

exclusão de todas as crianças não infectadas, a sensibilidade do teste foi de 73,9% devido a altas diluições utilizadas nas amostras de soro. Ao contrário do nosso estudo, Souza-e-Silva e colaboradores (2012) utilizando o teste de ELISA com antígenos recombinantes encontraram alta sensibilidade, porém baixa especificidade para IgG1, não sendo capaz de diferenciar os recém-nascidos não infectados dos infectados.

No presente trabalho a sensibilidade encontrada para IgG2 pela citometria de fluxo foi de 60,2%, ou seja, 53 das 88 amostras do grupo TOXO foram consideradas positivas, ao passo que nenhuma criança do grupo NI apresentou reatividade para esta subclasse na diluição escolhida, com especificidade de 100%.

De acordo com a literatura, a síntese de anticorpos de IgG específicos contra o *Toxoplasma* pelo recém-nascido parece envolver a subclasse IgG2 (BUFFOLANO et al., 2005; CAÑEDO-SOLARES et al., 2008). Em um estudo realizado por Cañedo-Solares e colaboradores (2008), os anticorpos IgG2 foram mais frequentes em crianças com toxoplasmose congênita (35%) do que em crianças não infectadas (5%). Em outro estudo conduzido por Buffolano e colaboradores (2005), foi verificado uma maior proporção de crianças infectadas congenitamente apresentando esta subclasse (65%). Souza-e-Silva e colaboradores (2012) encontraram sensibilidade ainda maior, de 95,9%, utilizando o ELISA com o antígeno recombinante rMIC3. Contudo, a especificidade do teste foi bastante baixa, de 27,2%, comparada aos nossos resultados.

A subclasse IgG3 também tem sido descrita como uma das imunoglobulinas sintetizadas pelo recém-nascido na defesa contra o *Toxoplasma* (BUFFOLANO et al., 2005). Segundo nosso estudo, a pesquisa de IgG3 por citometria de fluxo demonstrou maior capacidade para diagnosticar crianças com toxoplasmose congênita, com uma sensibilidade de 83%, agregado a capacidade de 100% de exclusão das crianças não infectadas. Corroborando os nossos achados, no estudo de Souza-e-Silva e colaboradores (2012), de todas as subclasses pesquisadas, a IgG3 foi a que apresentou melhor desempenho no ensaio de ELISA principalmente

quando utilizado o antígeno recombinante MIC3 para o diagnóstico da toxoplasmose congênita, com uma sensibilidade de 44% mas uma especificidade de 100%.

A Razão de Verossimilhança (RV) também confirmou um bom desempenho da pesquisa de IgG3 por citometria de fluxo. Os resultados positivos, superiores a 20% de PFP, foram associados a uma RV+ tendendo ao infinito, o que significa que a chance de resultados positivos do teste serem provenientes de crianças com toxoplasmose congênita é infinitamente maior do que de crianças não infectadas. Portanto, essas análises mostraram que resultados positivos (PFP>20%) para IgG3 podem contribuir para confirmar o diagnóstico de toxoplasmose congênita.

Aliado aos nossos resultados, a literatura relata que IgG3 anti-*T. gondii* são produzidos pelos recém-nascidos e sua presença indicaria uma resposta ativa contra o parasito, estando a criança provavelmente infectada, sendo esta subclasse um marcador de transmissão vertical do *T. gondii* (CAÑEDO-SOLARES et al., 2008).

Ao contrário das outras subclasses, quando se avaliou a pesquisa de IgG4 por citometria de fluxo para o diagnóstico da toxoplasmose congênita, altos níveis de reatividade foram encontrados tanto para as crianças do grupo TOXO quanto para as crianças NI. Assim, o teste apresentou uma alta sensibilidade de 94,7% porém uma baixa especificidade de 4,6%, indicando que o método não é capaz de diferenciar com acurácia as crianças não infectadas das infectadas. Diferente dos nossos achados, utilizando o antígeno recombinante MIC3 na pesquisa de IgG4 no teste de ELISA, Souza-e-Silva e colaboradores (2012) encontraram uma alta especificidade com apenas cerca de 5% das crianças não infectadas sendo reativas ao teste, mas uma sensibilidade de apenas 62,2%.

Visando, ainda, o desenvolvimento de um teste com maior sensibilidade, o próximo passo foi avaliar a aplicabilidade da avidéz de IgG pela técnica da citometria de fluxo como uma ferramenta complementar no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.

A avidéz de IgG geralmente não é utilizada como método de diagnóstico no recém-nascido com suspeita de infecção congênita devido principalmente ao fato de que os



resultados possam refletir a avidéz de IgG das mães (BUFFOLANO et al., 2004). Uma vez que a IgG no neonato representa uma combinação de anticorpos IgG da mãe e da própria criança e que os valores de avidéz são condicionados por vários fatores, como o tempo de amostragem, o título de IgG e avidéz da mãe assim como do recém-nascido (LAPPALAINEN; HEDMAN, 2004).

No entanto, um estudo recente demonstrou que crianças não infectadas possuem, significativamente, maiores índices de avidéz do que as crianças infectadas congenitamente (TORRES et al., 2013). Corroborando os dados deste estudo, nossos resultados mostraram que crianças não infectadas apresentaram altos índices de avidéz e que crianças com toxoplasmose congênita apresentaram baixa avidéz de IgG pós-natal. O método de avidéz de IgG por citometria de fluxo demonstrou sensibilidade de 97% e especificidade de 93% no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita. O desempenho obtido no trabalho de Said, Zaki e Abdelrazik (2011) foi comparável ao reportado em nosso estudo, com sensibilidade de 93,2% e especificidade de 98,3%. Segundo o estudo de Torres e colaboradores (2013) o teste de avidéz pós-natal apresentou sensibilidade de 60,9% e especificidade de 100%, demonstrando que o método pode fornecer informações úteis para o diagnóstico da toxoplasmose congênita, particularmente quando IgM e IgA não são detectáveis.

Para obtenção dos nossos resultados de avidéz, utilizou-se para o cálculo do índice de avidéz a comparação dos títulos dos anticorpos IgG com e sem uréia dos *end-point*, ou seja, na última diluição do soro com o estabelecimento de um PFP mínimo de 30% na curva de titulação de IgG sem uréia (SILVA-DOS-SANTOS et al., 2012). Para as crianças do grupo TOXO, que apresentavam maiores quantidades de anticorpos, foi necessário utilizar diluições maiores para o cálculo de avidéz, e mesmo assim, as crianças desse grupo apresentaram baixa avidéz de IgG. Embora para as crianças do grupo NI tenham sido necessárias utilizar diluições menores, os resultados mostraram IgG de alta avidéz, evidenciando que a avidéz é dependente da força de ligação do anticorpo com o antígeno e que a quantidade de anticorpo não influenciou nos resultados.

Essa abordagem utilizada na técnica de citometria de fluxo para o cálculo do índice de avides, baseado no *end-point* na titulação de IgG, com um valor mínimo de PFP, possui o benefício do resultado de avides ser independente da quantidade de IgG circulante na criança, mas associada a avaliação da afinidade funcional do anticorpo, sem a interferência das altas concentrações de IgG transferido passivamente pela mãe.

Acredita-se que a falta de padronização dos ensaios e a utilização da diluição única nos testes de avides, sem a técnica de titulação do anticorpo IgG, tem proporcionado uma interpretação equívoca da contribuição do método de avides no diagnóstico da toxoplasmose (KORHONEN et al., 1999; LAPPALAINEN; HEDMAN, 2004).

Assim, de acordo com a literatura, a baixa avides em crianças com infecção congênita reflete a imaturidade dos novos anticorpos sintetizados pelas crianças, uma vez que estas possuem a capacidade de produzir seus próprios anticorpos já no início do período pós-natal (TORRES et al., 2013). Tal fato já foi demonstrado pelos resultados do teste de Western Blot pela comparação de IgG da mãe e do neonato infectado (CHUMPITAZI et al., 1995; ROBERT-GANGNEUX et al., 1999).

Adicionalmente, foi também realizado uma análise comparativa da presença de IgG e IgG3 em crianças do grupo TOXO e NI com suas respectivas mães que tiveram exposição ao *T. gondii* na gestação visto que, atualmente, os métodos diagnósticos distinguem IgG materno e fetal com dificuldade (REMINGTON; MONTOYA, 2004). O teste de Western Blot possibilita esta distinção entre anticorpos produzidos pelo recém-nascido daqueles transferidos passivamente ao feto pela mãe, porém apresenta a desvantagem da complexidade do método e ao fato das análises dos resultados não serem automatizadas podendo gerar interpretações errôneas (MACHADO et al., 2010; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

De acordo com Lappalainen e Hedman (2004), durante os primeiros meses de vida, os anticorpos IgG transferidos passivamente ao neonato diminui, ao passo que a IgG endógena do recém-nascido infectado pelo parasito persisti ou aumenta. De fato, nossos resultados mostraram que no período de 30 a 45 dias de vida, as crianças não

infectadas apresentaram uma menor reatividade média de IgG e IgG3 em relação as suas respectivas mães, provavelmente, devido aos anticorpos transferidos passivamente a estas crianças pelas suas mães já terem diminuído com o passar do tempo. Em contraste, as crianças com toxoplasmose congênita apresentaram uma reatividade média semelhante a das suas respectivas mães, o que pode ser explicado pelo fato destas crianças estarem sintetizando seus anticorpos em resposta a infecção pelo *T. gondii*.

Cañedo-Solares e colaboradores (2008) relataram em seu estudo que a identificação das subclasses IgG2, IgG3 e IgG4 nos recém-nascidos e a comparação do perfil desses anticorpos com suas respectivas mães pode ser útil no diagnóstico da toxoplasmose congênita logo após ao nascimento. Diante disso, estudos posteriores ainda precisam ser realizados para observar se as outras subclasses apresentam comportamento semelhante ao encontrado para IgG3 pela citometria de fluxo e encontrar uma razão entre os títulos de anticorpos das crianças e suas mães que seja fortemente sugestivo de infecção congênita para auxiliar no diagnóstico laboratorial da toxoplasmose congênita.

Em suma, com base no desempenho da pesquisa de IgG3 e avidéz de IgG por meio da citometria de fluxo, no presente trabalho foi possível sugerir um novo método complementar para o diagnóstico laboratorial dos recém-nascidos suspeitos de infecção congênita pelo *T. gondii*.

Considerando que uma estratégia para aumentar o desempenho de testes diagnósticos é utilizar a associação de testes, nosso estudo propõe um algoritmo utilizando o teste de IgM pelo método convencional disponível na rotina dos laboratórios clínicos como estratégia inicial no diagnóstico da toxoplasmose congênita. Assim, um resultado positivo poderia orientar o médico para o início imediato do tratamento específico. Entretanto, em crianças com IgM negativo e com suspeita de toxoplasmose congênita os casos deveriam ser confirmados em um centro de referência por meio da utilização da pesquisa de IgG3 e avidéz de IgG pela citometria de fluxo. Em relação ao algoritmo utilizando IgM seguido de IgG3, destacam-se como vantagens o bom desempenho final da associação dos métodos com 89% de sensibilidade além da facilidade e menor tempo de execução e gasto

---

com reagentes. Posteriormente, seria realizado o teste de avides de IgG em um menor número de neonatos, que foram negativos para IgG3, com um excelente desempenho final do método com 98% de sensibilidade. Apesar da utilização do algoritmo de IgM seguido diretamente da avides de IgG ter obtido o mesmo desempenho final de 98% de sensibilidade deve-se considerar que o método é relativamente mais laborioso com maior tempo de execução e gasto com reagentes.

Dessa forma, a associação da pesquisa de IgG3 seguida de avides de IgG ou somente avides de IgG em crianças com IgM negativo mostrou que poderia ser uma importante ferramenta complementar no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita pós-natal, sendo capaz de detectar grande parte das crianças infectadas congenitamente pelo *T. gondii*.

Vale ainda ressaltar que a elevada sensibilidade da reação de imunofluorescência por citometria de fluxo é devida provavelmente ao método de detecção por fotomultiplicadores associado à possibilidade de se trabalhar com maiores diluições das amostras comparadas às utilizadas nos métodos convencionais. Outra vantagem da técnica é a utilização de parasitos íntegros fixados como fonte de antígeno. Além disso, vários laboratórios de referência têm investido na aquisição de um citômetro de fluxo que poderá contribuir para o emprego desse novo método no campo do diagnóstico sorológico da toxoplasmose congênita.

## 6. CONCLUSÕES

1. O desempenho da pesquisa dos anticorpos IgM por citometria de fluxo foi inferior ao do teste convencional ELFA. Em contraste, a pesquisa de IgA apresentou um melhor desempenho em relação ao ELFA no diagnóstico sorológico da toxoplasmose congênita;
2. Para a pesquisa das subclasses de IgG a que apresentou melhor desempenho para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose congênita pós-natal foi IgG3;
3. O teste de avidéz de IgG pela citometria de fluxo obteve um ótimo desempenho;
4. As crianças com toxoplasmose congênita apresentaram uma reatividade média de anticorpos IgG e IgG3 equivalentes as suas respectivas mães, o que sugere estarem sintetizando estes anticorpos em resposta a infecção pelo *T. gondii*;
5. Foi possível estabelecer um algoritmo para o diagnóstico da toxoplasmose congênita utilizando o teste de IgM pelo método convencional, associado à pesquisa de IgG3 e avidéz de IgG por citometria de fluxo, com 98% de sensibilidade, demonstrando a possibilidade de uma ferramenta complementar para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBASI, M. et al. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 608–616, 2003.
- AREAL, K.R.; MIRANDA, A.E. Soroprevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas na rede básica de saúde de Vitória, ES. **NewsLab**, v. 87, p. 122-129, 2008.
- AVELINO, M.M. et al. Congenital toxoplasmosis and prenatal care state programs. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p.33, 2014.
- BAHIA-OLIVEIRA, L.M. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 55– 62, 2003.
- BARBOSA, B.F. et al. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 151, p. 536–545, 2008.
- BARROS, Geisa Baptista. Estudo longitudinal de marcadores sorológicos para o imunodiagnóstico da toxoplasmose aguda humana. Minas Gerais: UFMG, 2009. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- BEGHETTO, E. et al. A combination of antigenic regions of *Toxoplasma gondii* microneme proteins induce protective immunity against oral infection with parasite cysts. **J. Infect. Dis.**, v. 191, p. 637-645, 2005.
- BEGHETTO, E. et al. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. **J. Clin. Microbiol.** 44: 2133-2140, 2006.
- BEN ABDALLAH, R. Dépistage de la toxoplasmose materno-foetale: étude des cas suivis à l'Institut Pasteur de Tunis (2007-2010). **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 106, p. 108-112, 2013.
- BESSIERES, M.H. et al. IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. **J Clin Pathol**, v. 45, n. 7, p. 605-608, 1992.
- BESSIERES, M.H. et al. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 94, p. 37–45, 2001.
- BESSIERES, M.H. et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 389-392, 2009.

- BOLLANI, L.; STROCCHIO, L.; STRONATI, M. Congenital toxoplasmosis. **Early Human Development**, v. 89, s. 4, p. S70–S71, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde. 1 edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BROOKS, R.G; REMINGTON, J.S. Transplant-related infections. In: Bennett JV, Brachman PS, eds. **Hospital Infections**. 2 ed. Boston: Little, Brown and Co, 1986.
- BUFFOLANO, W. et al. Delayed maturation of IgG avidity in congenital toxoplasmosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, p. 825–830, 2004.
- BUFFOLANO, W. et al. Use of Recombinant Antigens for Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5916–5924, 2005.
- BURG, J.L. et al. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.**, v. 141, p. 3584–3591, 1988.
- CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Rev. Inst. Med. trop.**, v. 6, p. 117, 1964.
- CAMARGO, M.E.; LESER, P.G.; ROCCA, A. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-Toxoplasma fluorescent tests. A technique for specific results. **Rev Inst Med Trop**, v. 14, n. 5, p. 310-313, 1972.
- CAMARGO, M.E. et al. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infection and immunity**, v. 21, n. 1, p. 55-58, 1978.
- CAÑEDO-SOLARES, I. et al. Congenital toxoplasmosis specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. **The Pediatrics Infectious Disease Journal**, v. 27, n. 5, p. 469 – 474, 2008.
- CAPOBIANGO, J.D. et al. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, 2014.
- CARELLOS, E.V.M. et al. Congenital toxoplasmosis in the state of Minas Gerais, Brazil: a neglected infectious disease?. **Epidemiol. Infect.**, v. 142, p. 644–655, 2014.
- CARLIER, Y. et al. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Trop.**, v. 121, n. 2, p. 55-70, 2012.
- CHUMPITAZI, B.F.F. et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1479–1485, 1995.

- COOK, A.J. et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. **BMJ**, v. 321, p. 142–147, 2000.
- COUVREUR, J. et al. In utero treatment of toxoplasmic fetopathy with the combination pyrimethamine-sulfadiazine. **Fetal Diagn Ther.**, v. 8, p. 45-50, 1993.
- COUTO, J.C.F; AVELINO, M.M; FERREIRA, Q.T.M. Toxoplasmose e gestação. COUTO, J.C.F; ANDRADE, G.M.Q; TONELLI, E. Infecções perinatais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 445.
- COZON, G. et al. An improved assay for the detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in human serum by flow cytometry. **Cytometry**, v. 14, p. 569, 1993.
- DE AZEVEDO, K. M. L. et al. Congenital toxoplasmosis transmitted by human immunodeficiency-virus infected women. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 186–189, 2010.
- DELICIO, A. M. et al. Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus in a ten years period. **Reproductive Health**, v. 8, p. 35, 2011.
- DUBEY, J.P.; BEATTIE C.P. **Toxoplasmosis of Animals and Man**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988.
- DUBEY; J.P.; MILLER,N.L.; FRENKEL, J.K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 132, n. 4, p. 636–662, 1970.
- DUBEY, J.P; FRENKEL, J.K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **J. Protozool.**, v. 19, p. 155–177, 1972.
- DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol**, v. 28, p. 1019 –1024, 1998.
- DUBEY, J.P. The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.
- DUBEY, J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 877–882, 2009.
- DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2 ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2010.
- DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, p. 1375–1424, 2012.
- DUFFY, K.T. et al. Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting toxoplasma specific IgM. **J clin pathol.**, v. 42, p. 1291-1295, 1989.



DUGIMONT, J. C.; BOUT, D.; WATTRE, P.; CAPRON, A. Apport des methodes immunoenzymologiques en diagnostic de masse, et a la surveillance de la toxoplasmose humaine. **Biomedicine**, 1975.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. ELISA. Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871–874, 1971.

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clin Microbiol Rev.**, v. 26, n. 1, p. 58-85, 2013.

EVANS, R. **Life cycle and animal infection**. In: Ho-Yen, DO.; Joss, AWL., editors. Human toxoplasmosis. Oxford: Oxford University Press, p. 26-55, 1992.

FAURE, A.K. et al. Lack of value of specific IgA detection in the postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 13, p. 27–30, 1999.

FERREIRA, A.W.; MORAES, S.L. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

FILICE, G.A.; YEAGER, A.S.; REMINGTON, J.S. Diagnostic Significance of Immunoglobulin M Antibodies to *Toxoplasma gondii* Detected After Separation of Immunoglobulin M from Immunoglobulin G Antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 336-342, 1980.

FILISETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann Ist Super Sanità**, v. 40, p. 71–80, 2004.

FRICKER-HIDALGO, H. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparative value of fetal blood and amniotic fluid using serological techniques and cultures. **Prenatal Diagnosis**, v. 17, n. 9, p. 831–835, 1997.

FRICKER-HIDALGO, H. et al. Value of *Toxoplasma gondii* detection in one hundred thirty-three placentas for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 26, n. 9, p. 845-846, 2007.

FOULON, W. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: A multicenter evaluation of different diagnostic parameters. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 181, p. 843-847, 1999.

FOUDRINIER, F. et al. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1681–1686, 2003.

GARIN, J.P.; AMBROISE-THOMAS, P. Le diagnostic serologique de la toxoplasmose par la méthode des anticorps fluorescents (Technique indirecte). **Presse Med.**, v. 71, n. 52, p. 2485-2488, 1963.

- GILBERT, R.E. et al. Screening for congenital toxoplasmosis: accuracy of immunoglobulin M and immunoglobulin A tests after birth. **J Med Screen**, v. 14, n. 1, p. 8–13, 2007.
- GÓMEZ-MARÍN, J.E. Congenital toxoplasmosis in South American children. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 103-107, 2010.
- GOULART, A.L. Toxoplasmose congênita. In: KOPELMAN, B.I. Diagnóstico e tratamento em neonatologia. São Paulo: Atheneu, 2004. p.434.
- GREINER, M.; SOHR, D.; GÖBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **J. Immunol. Methods.**, v. 185, p. 123-132, 1995.
- GREINER, M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. **J. Immunol. Methods.**, v.185, p. 145-146, 1995.
- GROVER, C.M. et al. Rapid prenatal diagnosis of congenital toxoplasma infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 10, p. 2297-2301, 1990.
- HEGAB, S.M.; AL-MUTAWA, S.A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clin Exp Med.**, v. 3, p. 84–105, 2003.
- HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect.**, v. 8, n. 10, p. 634-40, 2002.
- HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 6, n. 1, p. 41–61, 2005.
- HOHLFELD, P. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. **The New England Journal Of Medicine**, v. 331, n. 11, p. 695-699, 1994.
- JANKŮ, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of the “congenital coloboma” of the macula lutea in an eye of normal size, with microscopic detection of parasites in the retina, 62, 1021–1027, 1052–1059, 1081–1085, 1111-1111, 1138–1143 , 1923.
- JONES, J.L. et al. Toxoplasma gondii Infection in the United States: Seroprevalence and Risk Factors. **American Journal of Epidemiology**, v. 154, n. 4, p. 357-365, 2001.
- JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Waterborne toxoplasmosis-Recent developments. **Exp Parasitol**, v. 124, p. 10-25, 2010.

- KASPER, L.H.; CURRIE, K.M.; BRADLEY, M.S. An unexpected response to vaccination with pacified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.**, v. 134, p. 3426–3431, 1985.
- KAISER, K. et al. Multicenter proficiency study for detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid by nucleic acid amplification methods. **Clinica Chimica Acta**, v. 375, p. 99–103, 2007.
- KAWAZOE, U.; MINEO, J.R. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D.P. *Parasitologia humana*. 12 ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 179-180
- KELEN, A.E. et al. Indirect fluorescence antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis. **Canad. J. Microbiol.**, v. 8, p. 545-54, 1962.
- KORHONEN, M.H. et al. A new method with general diagnostic utility for the calculation of immunoglobulin G avidity. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 6, n. 5, p. 725–728, 1999.
- KRAVETZ, J.D; FEDERMAN, D.G. Toxoplasmosis in pregnancy. **Am J Med.**, v. 118, n. 3, p. 212–216, 2005.
- KHAMMARI, I. et al. IgG Western Blot for Confirmatory Diagnosis of Equivocal Cases of Toxoplasmosis by EIA-IgG and Fluorescent Antibody Test. **Korean J Parasitol.**, v. 51, n. 4, p. 485–488, 2013.
- LAGO, E.G.; OLIVEIRA, A.P.; BENDER, A.L. Presence and duration of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M in infants with congenital toxoplasmosis. **Jornal de Pediatria**, v. 142, p. 1-7, 2014.
- LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cell Microbiol.**, v. 12, p. 292–300, 2010.
- LAPPALAINEN, M.; HEDMAN, K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. **Ann Ist Super Sanità**, v. 40, n. 1, p. 81-88, 2004.
- LEBECH, M. et al. Classification System and Case Definitions of *Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompetent Pregnant Women and Their Congenitally Infected Offspring. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 15, n. 10, p. 799-805, 1996.
- LEBECH, M. et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. Danish Congenital Toxoplasmosis Study Group. **Lancet**, v. 353, n. 9167, p. 1834-1837, 1999.
- LECOMTE, B. et al. Atypical neurological form of congenital toxoplasmosis after maternal seroconversion in the first trimester of pregnancy: severe manifestation at 2 months of age. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 124, p. 254-259, 2006.

- MACHADO, A.S. et al. IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 757-761, 2010.
- MARTINS-FILHO, O.A. et al. 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.**, v. 2, n. 5, p. 569-573, 1995.
- MCLEOD, R. Utility and limitations of *T. gondii*-specific IgM serumantibodies in the diagnosis of congenital toxoplasmosis in Porto Alegre. **Jornal de Pediatria**, v. 162, p. 1-3, 2014.
- MONTOYA, J.G. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, s. 1, p. S73-82, 2002.
- MONTOYA, J.G; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
- MONTOYA, J.G.; ROSSO, F. Diagnosis and Management of Toxoplasmosis. **Clin Perinatol**, v. 32, p. 705-726, 2005.
- MONTOYA, J.G; REMINGTON, J.S. Management of *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 554-566, 2008.
- NAESSENS, A. et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: A multicenter evaluation. **The Journal of Pediatrics**, v. 135, n. 6, p. 714-719, 1999.
- NAOT, Y.; REMINGTON, J.S. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, v. 142, p. 757-766, 1980.
- NAOT, Y.; DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. **The Journal Of Pediatrics**, v. 98, n. 1, p. 32-36, 1981.
- NETO, E.C; AMORIM, F.; LAGO, E.G. Estimation of the regional distribution of congenital toxoplasmosis in Brazil from the results of neonatal screening. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 64-70, 2010.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus des Séances del' Academie des Sciences**, v. 147, p. 763-766, 1908.
- NICOLLE, C. AND MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus des Séances del' Academie des Sciences**, v. 148, p. 369-372, 1909.
- PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 12, p. 214-223, 2007.

PFAFF, A.W. et al. Toxoplasma gondii regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblasts. **Immunol. Cell Biol.**, v. 83, p. 483–489, 2005.

PFAFF, A.W. et al. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. **Parasitology**, v. 134, p. 1895–1902, 2007.

PINON, J.M. et al. Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-toxoplasma gondii immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 579–583, 1996.

PINON, J.M. et al. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2267–2271, 2001.

RABILLOUD, M.; WALLON, M.; PEYRON, F. In Utero and at Birth Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis Use of Likelihood Ratios for Clinical Management. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 5, p. 421-425, 2010.

RAISANEN, S.A. The importance of trophozoites in transmission of toxoplasmosis: survival and pathogenicity of Toxoplasma gondii trophozoites in liquid media. **Med Hypotheses**, v. 4, p. 367–75, 1978.

REMINGTON J.S. The present status of the IgM fluorescent antibody technique in the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The Journal of Pediatrics**, v. 75, n.6, p. 1116-1124, 1969.

REMINGTON, J.S.; GENTRY, L.O. Acquired toxoplasmosis: infection versus disease. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 174, n. 2, p. 1006-1017, 1970.

REMINGTON, J.S.; ARAUJO, F.G.; DESMONT, G. Recognition of different Toxoplasma antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 1020-1024, 1985.

REMINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; DESMONT, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S.; Klein, J.O., editors. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 5 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 205–346, 2001.

REMINGTON, J.S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J.G. Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 941-945, 2004.

REMINGTON J.S. et al. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S.; Klein, J.O.; Wilson, C.B.; Baker, C., editors. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 6 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2006.

- ROBERT-GANGNEUX, F. et al. Value of Prenatal Diagnosis and Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Retrospective Study of 110 Cases. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 9, p. 2893-2898, 1999.
- ROBERT-GANGNEUX, F. et al. Clinical Relevance of Placenta Examination for the Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 1, p. 33-38, 2010.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.
- ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **Journal of Infection**, v. 68, p. S125-S133, 2014.
- RODRIGUES, I.M.X. et al. Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for the detection of anti-Toxoplasma gondii IgM and IgA antibodies. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 104, n. 3, p. 434-440, 2009.
- RORMAN, E. et al. Congenital toxoplasmosis—prenatal aspects of Toxoplasma gondii infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, p. 458–472, 2006.
- ROMAND, S. et al. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 97, n. 2, p. 296-300, 2001.
- SABIN, A.B. Toxoplasmosis. A recently recognized disease of human beings. **Adv. Pediatr.**, v. 1, p. 1–53, 1942.
- SABIN A.B; FELDMAN H.A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, p. 660–663, 1948.
- SACKS, J.J.; ROBERTO, R.R.; BROOKS, N.F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **JAMA.**, v. 248, p. 1728–32, 1982.
- SAID, R.N; ZAKI, M.M; ABDELRAZIK, M.B. Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Molecular and Serological Methods for Achieving Economic and Early Diagnosis Among Egyptian Preterm Infants. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 57, n. 5, p.333-339, 2011.
- SAITO, S. Cytokine network at the feto–maternal interface. **J Reprod Immunol.**, v. 47, n. 2, p. 87–103, 2000.
- SCHWARTZMAN, J. et al. Congenital toxoplasmosis. **J. Pediatr**, v. 33, p. 66–73, 1948.
- SENSINI, A. Toxoplasma gondii infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clin Microbiol Infect.**, v. 12, p. 504–512, 2006.

- SIALA, E. et al. Toxoplasmic infections in pregnancy: About 94 cases diagnosed at the Pasteur Institute of Tunis. **Gynecol Obstet Fertil.**, v. 42, n. 5, p. 312-316, 2014.
- SILVA-DOS-SANTOS, P.P. et al. Flow cytometry-based algorithm to analyze the anti-fixed *Toxoplasma gondii* tachyzoites IgM and IgG reactivity and diagnose human acute toxoplasmosis. **J Immunol Methods.**, v. 378, p. 33-43, 2012.
- SILVEIRA, C. et al. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. **American journal of ophthalmology**, v. 136, n. 2, p. 370-371, 2003.
- SIMISTER, N. Placental transport of immunoglobulin G. **Vaccine**, v. 21, n. 24, p. 3365 – 3369, 2003.
- SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J.F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, v. 31, p. 1293–1302, 2001.
- SOUZA-E-SILVA, C.H. et al. Early diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborn infants using IgG subclasses against two *Toxoplasma gondii* recombinant proteins. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 342-347, 2012.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. Incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. Nota preliminare pel. **Rev. Soc. Scient.**, v. 3, p. 109–112, 1908.
- STERKERS, Y. et al. Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: a 4-year survey. **Clin Microbiol Infect.**, v. 16, n. 10, p. 1594-1602, 2010.
- SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 3, p. 137-42, 2006.
- TENTER, A.M; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217–1258, 2000.
- TORRES, E. et al. Evaluation of igt anti-toxoplasma avidity and polymerase chain reaction in the postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 6, p. 693-695, 2013.
- VOGEL, N. et al. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. **Clin Infect Dis**, v. 23, p. 1055–1060, 1996.
- VOLLER, A. et al. A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. **J. Clin. Path.**, v. 29, p. 150-153, 1976.

- VILLENA, I. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis transmitted by an immunocompetent woman infected before conception. **Prenat Diagn**, v. 18, n. 10, p. 1079-81, 1998.
- VILLENA, I. et al. Detection of specific IgE during maternal, fetal, and congenital toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3487–3490, 1999.
- WALLS, K.W.; BULLOCK, S.L.; ENGLISH, D.K. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its microadaptation for the serodiagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 273-277, 1977.
- WALLON, M. et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA?. **Eur J Pediatr.**, v. 158, p. 645-649, 1999.
- WEISS, L.M.; DUBEY, J.P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **Int. J. Parasitol.**, v. 39, p. 895–901, 2009.
- WILSON, M.; MCAULEY, J.M. **Toxoplasma**. In: MurrayPR, ed. Manual of clinical microbiology. 7 ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1999.
- WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B.H. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. **Science**, v. 89, p. 226–227, 1939a.
- WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B.H. Toxoplasmic encephalomyelitis III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. **Am. J. Pathol**, v. 15, p. 657–694, 1939b.