

**CARLOS HENRYQUE DE SOUZA E SILVA**

**PERFIL DE IMUNOGLOBULINAS G E SUAS SUBCLASSES  
EM RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE  
CONGÊNITA EM MINAS GERAIS, BRASIL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BELO HORIZONTE – MG  
2011**

**Carlos Henrique de Souza e Silva**

**Perfil de Imunoglobulinas G e suas Subclasses em Recém-nascidos com Toxoplasmose Congênita em Minas Gerais,  
Brasil**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**Orientador: Ricardo Wagner de Almeida Vitor**

**Co-orientadora: Gláucia Manzan Queiroz de Andrade**

**Belo Horizonte**

**2011**

Silva, Carlos Henryque de Souza e  
Perfil de imunoglobulinas G e suas subclasses em recém-nascidos com  
toxoplasmose congênita em Minas Gerais, Brasil. [manuscrito] / Carlos  
Henryque de Souza e Silva. – 2011.  
159 f. : Il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ricardo Wagner de Almeida Vitor. Co-orientadora: Gláucia  
Manzan Queiroz de Andrade.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas.

1. Recém-nascidos – Teses. 2. *Toxoplasma gondii* – Teses. 3.  
Imunoglobulina G - Teses. 4. Teste imunoenzimático – Teses. 5.  
Parasitologia – Teses. 6. Toxoplasmose congênita. 7. Toxoplasmose  
congênita/ diagnóstico. I. Vitor, Ricardo Wagner de Almeida. II. Andrade,  
Gláucia Manzan Queiroz de. III. Universidade Federal de Minas Gerais.  
Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616.993.19

## **COLABORAÇÃO:**

Dr. José Nélio Januário, NUPAD, UFMG

Dra. Luciana Macedo – Audiologia do HC, UFMG

Dr. Daniel Vitor Vasconcelos-Santos - Faculdade de Medicina, UFMG

Dra. Mariangela Carneiro - Dep. Parasitologia – UFMG

Doutoranda Ana Carolina de Aguiar Vasconcelos Carneiro - Dep. Parasitologia –  
UFMG

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente à minha nova família (Flavi, Alana e Caio) que foi crescendo durante esses quatro anos de Doutorado e que sempre esteve ao meu lado nos situações de aperto e de alegria, entendendo a minha ausência em certos momentos.
- Aos meus pais, Pedro e Eliana, meus irmãos Gustavo, Priscila e Camila e todos os meus familiares, os quais, apesar da distância sempre me apoiaram.
- Ao meu Orientador (com “O” maiúsculo!) Ricardo Wagner de Almeida Vitor por confiar em mim, mesmo não me conhecendo direito no início do trabalho, e que sempre se mostrou dedicado e pronto a ajudar naquilo que fosse preciso, independente de ser assuntos de trabalho ou assuntos pessoais.
- À Rosa (Rosálida Estevan Nazar Lopes) pelo suporte não só técnico, mas principalmente emocional, sempre com conselhos oportunos os quais vão ser levados comigo para o resto da vida! Muito Obrigado!
- À secretária do Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Sumara, pelo apoio e grande atenção dada em todos os momentos.
- Ao professor Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo da Universidade Federal de Viçosa, por sempre acreditar em mim e nunca deixar que algo desanimasse.
- Aos meus amigos Angelo, Gustavo, Marquinho da banda The Dark Side pelos momentos de alegria em cima e fora dos palcos e por sempre estarem sempre ao meu lado.
- Aos meus companheiros de trabalho do Laboratório de Toxoplasmose, Carol, Letícia, Anderson, Milena, Júlia, Breno, Matheus, Mariana e Renata, os quais ajudaram muito no meu novo ambiente de trabalho.
- Às minhas colegas do Laboratório de Protozoologia, Camila, Júlia, Diana e Mercês, as quais tornaram mais fácil a minha adaptação numa Universidade até então estranha para mim.

- À Professora Mariangela Carneiro a qual sempre se mostrou disponível para me aconselhar nas análises estatísticas.
- À Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, e Núcleo de Ações e Pesquisas em Apoio Diagnóstico (NUPAD) na pessoa da Professora Gláucia Manzan Queiróz de Andrade, pelo magnífico trabalho desenvolvido, o qual foi a base para o desenvolvimento do presente estudo.
- À Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais pelo desenvolvimento e suporte dado para a realização dos trabalhos iniciais, os quais foram fundamentais para a realização do presente estudo.
- Às crianças e mães participantes do presente estudo, as quais apesar dos transtornos causados pela toxoplasmose consentiram com o trabalho do NUPAD, tornando possível a conclusão deste trabalho.
- Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, na pessoa de sua coordenadora Professora Érika Martins Braga, pela oportunidade de realização deste trabalho.
- Ao Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG na pessoa de seu chefe Professor Marcos Pezzi Guimarães.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>X</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Biologia.....	7
2.2 Hospedeiros.....	11
2.3 Fontes de Infecção .....	13
2.4 Sinais Clínicos .....	16
2.5 Epidemiologia .....	17
2.6 Resposta Imune na Toxoplasmose .....	19
2.7 Diagnóstico.....	23
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 Objetivo Geral .....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
5.1 Pacientes e Banco de dados.....	30
5.2 Plasmas analisados .....	35
5.3 Antígenos de <i>T. gondii</i> .....	35
5.4 Teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	36
5.5 Análise Estatística.....	38
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
6.1 Padronização do teste de ELISA .....	42
6.1.1 STAg.....	43
6.1.2 rSAG1 .....	46
6.1.3 rMIC3 .....	49

<b>6.2 ELISA em plasma de 217 recém nascidos com suspeita de toxoplasmose congênita.</b>	<b>52</b>
<b>6.3 Análise dos Índices de Sensibilidade, Especificidade, Razão de Verossimilhança</b>	<b>59</b>
6.3.1 STAg	59
6.3.2 r SAG1	60
6.3.3 r MIC3	61
<b>6.4 Análise comparativa da sorologia das mães e dos respectivos recém-nascidos</b>	<b>62</b>
<b>6.5 Associação dos Resultados do ELISA e o Diagnóstico Clínico de Retinocoroidite em Crianças com Toxoplasmose Congênita</b>	<b>69</b>
6.5.1 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígenos Totais Solúveis de <i>Toxoplasma gondii</i> (STAg)	69
6.5.2 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante SAG1 (rSAG1) de <i>Toxoplasma gondii</i>	73
6.5.3 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante MIC3 (rMIC3) de <i>Toxoplasma gondii</i>	77
<b>6.6 Associação dos Resultados do ELISA e a Avaliação Auditiva em Crianças com Toxoplasmose Congênita</b>	<b>81</b>
6.6.1 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígenos Solúveis Totais (STAg) de <i>Toxoplasma gondii</i>	81
6.6.2 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante SAG1 (rSAG1) de <i>Toxoplasma gondii</i>	84
6.6.3 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante MIC3 (rMIC3) de <i>Toxoplasma gondii</i>	86
<b>6.7 Associação dos Resultados do ELISA e o Diagnóstico de Alterações Neurológicas (Calcificações Cerebrais) em Crianças com Toxoplasmose Congênita</b>	<b>88</b>
6.7.1 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígenos Solúveis Totais (STAg) de <i>Toxoplasma gondii</i>	88
6.7.2 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante SAG1 (rSAG1) de <i>Toxoplasma gondii</i>	91
6.7.3 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante MIC3 (rMIC3) de <i>Toxoplasma gondii</i>	93
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>95</b>
<b>7.1 Sensibilidade e Especificidade do ELISA em 217 recém-nascidos com suspeita de toxoplasmose congênita</b>	<b>97</b>
<b>7.2 Análise comparativa de mães e respectivos filhos</b>	<b>100</b>
<b>7.3 Associação de anticorpos IgG e morbidade</b>	<b>101</b>
7.3.1 Associação de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> e lesão ocular	101
7.3.2 Associação de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> e déficit auditivo	106
7.3.3 Associação de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> e alterações neurológicas	107
7.3.4 Considerações Finais	108
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>111</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>113</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>135</b>



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fluxograma da triagem neonatal para toxoplasmose congênita em Minas Gerais, realizada no período de nov/2006 a mai/2007. .... 32
- Figura 2. Fluxograma dos exames clínicos realizados nas 175 crianças com toxoplasmose congênita identificadas na triagem neonatal em Minas Gerais no período de novembro de 2006 a maio de 2007. SAN: sem alteração neurológica; AN: com alteração neurológica; SL: sem lesão ocular; LA: retinocoroidite ativa; LC: retinocoroidite cicatrizada; LAC: retinocoroidite ativa e cicatrizada; SCA: sem comprometimento auditivo; DA: déficit auditivo. .... 34
- Figura 3. Modelo para avaliação da validade de um teste diagnóstico ..... 39
- Figura 4. Comparação do tempo de bloqueio (60 e 120 minutos) e da reatividade de duas diluições de estreptavidina-peroxidase (1:4000 e 1:20000) para o teste de ELISA pesquisando IgG total contra STAg. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas..... 42
- Figura 5. Comparação entre duas concentrações de STAg (0,5µg/ml e 1,0 µg/ml) e duas diluições do conjugado (1:20000 e 1:40000) para utilização em teste de ELISA para pesquisa de IgG total anti-STAg. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas ..... 43
- Figura 6. Influência da solução de bloqueio e da diluição do plasma no teste de ELISA com STAg para pesquisa de anticorpos IgG totais. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas..... 44
- Figura 7. Comparação da utilização de duas soluções de bloqueio (Leite em pó desnatado a 5% e gelatina 0,2%) e três diluições do conjugado anti-IgG1 (1:1000,1:2000 e 1:4000) para o teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas. .... 45
- Figura 8. Comparação da reatividade de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* utilizando diferentes diluições do plasma (1:50, 1:100 e 1:200) e do conjugado (1:4000 e 1:8000) e concentrações do STAg (0,5µg/well e 1,0ug/well). Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas..... 45
- Figura 9. Comparação da utilização de duas concentrações do antígeno (0,25µg/well e 0,5µg/well) e três soluções de bloqueio (Leite desnatado 5%, soro fetal bovino 2% e caseína 2%) para o teste de ELISA na pesquisa de anticorpos IgG totais anti-rSAG1 de *T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas. .... 47
- Figura 10. Comparação da reatividade de duas diluições do plasma (1:50 e 1:100) e três diluições do conjugado (1:5000, 1:10000 e 1:20000) para utilização em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG totais anti-rSAG1 de *T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas..... 47
- Figura 11. Comparação da utilização de duas concentrações do antígeno rSAG1 (0,25µg/well e 0,5µg/well) e três soluções de bloqueio (Leite desnatado 5%, soro fetal

bovino 2% e caseína 2%) para o teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas..... 48

Figura 12. Comparação da reatividade de duas diluições do plasma (1:50 e 1:100) e três diluições do conjugado (1:5000, 1:10000 e 1:20000) para utilização em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1 anti-rSAG1 de *T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas..... 49

Figura 13. Comparação da utilização de duas concentrações do antígeno rMIC3 (0,25µg/well e 0,5µg/well) e duas diluições do conjugado (1:5000 e 1:15000) para o teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas..... 50

Figura 14. Comparação da reatividade de três diluições do soro (1:50 e 1:100 e 1:200) sem ou com bloqueio (leite desnatado 5%) para utilização em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas..... 51

Figura 15. Comparação entre a utilização de duas concentrações do antígeno rMIC3 (0,25µg/well e 0,5µg/well) e duas soluções de bloqueio (Leite desnatado 5% e soro fetal bovino 2%) para o teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* quando utilizado em duas diluições distintas do conjugado (1:5000 e 1:10000). Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas..... 51

Figura 16. Comparação da reatividade de duas diluições do plasma (1:50 e 1:100) e duas diluições do conjugado (1:5000 e 1:15000) para utilização em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1 anti-rMIC3 de *T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas..... 52

Figura 17. Prevalência da resposta de IgG e subclasses para STAg e as duas proteínas recombinantes. Os plasmas foram considerados positivos quando os valores de IR (índice de reatividade) foram superiores a 1. a. IgG total; b. IgG1; c. IgG2; d. IgG3 e e. IgG4. Símbolos iguais acima das colunas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na proporção de plasmas positivos utilizando diferentes antígenos, pelo teste de McNemar. .... 54

Figura 18. Reatividade de IgG e subclasses para STAg e as duas proteínas recombinantes em plasma de 175 crianças com toxoplasmose congênita e 42 crianças não-infectadas. Os plasmas foram considerados positivos quando os valores de IR (índice de reatividade) foram superiores a 1. a. IgG total; b. IgG1; c. IgG2; d. IgG3 e e. IgG4. Asterisco indica  $p < 0,05$ . .... 56

Figura 19. Índice de reatividade de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita empregando a. STAg b. rSAG1 e c. rMIC3. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às medianas das determinações. Índice de Reatividade: densidade óptica do plasma teste/cut off. .... 58

Figura 20. Comparação entre os índices de reatividade (IR) de mães e recém-nascidos no teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG utilizando proteínas totais de *T. gondii* como antígeno; a. IR para IgG total; b. IR para IgG1; c. IR para IgG2; d. IR para

IgG3; e. IR para IgG4. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias das determinações. Índice de Reatividade: densidade óptica do plasma teste/cut off. Asterisco indica médias significativamente diferentes..... 65

Figura 21. Índice de reatividade de anticorpos IgG4 anti-STAg em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada)..... 73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sumário dos parâmetros ideais para execução do ELISA utilizando STAg. .	46
Tabela 2. Sumário dos parâmetros ideais para execução do ELISA utilizando rSAG1 de <i>T. gondii</i> .....	49
Tabela 3. Sumário dos parâmetros ideais para execução do ELISA utilizando rMIC3 de <i>T. gondii</i> .....	52
Tabela 4. Reatividade de 217 amostras de plasma (175 crianças com toxoplasmose congênita confirmada e 42 crianças normais) de crianças para IgG total e subclasses anti- <i>T. gondii</i> .....	55
Tabela 5. Medidas estatísticas dos índices de reatividade de anticorpos IgG e subclasses anti- <i>T. gondii</i> em crianças com toxoplasmose congênita empregando STAg.....	57
Tabela 6. Medidas estatísticas dos índices de reatividade de anticorpos IgG e subclasses anti- <i>T. gondii</i> em crianças com toxoplasmose congênita empregando como antígeno rSAG1.....	57
Tabela 7. Medidas estatísticas dos índices de reatividade de anticorpos IgG e subclasses anti- <i>T. gondii</i> em crianças com toxoplasmose congênita empregando como antígeno proteína recombinante MIC3 de <i>T. gondii</i> . .....	57
Tabela 8. Determinação da validade dos testes de ELISA utilizando STAg para pesquisa de anticorpos IgG totais e suas subclasses.....	60
Tabela 9. Determinação da validade dos testes de ELISA utilizando como antígeno a proteína recombinante de <i>T. gondii</i> SAG1 para pesquisa de anticorpos IgG totais e suas subclasses. ....	61
Tabela 10. Determinação da validade dos testes de ELISA utilizando como antígeno a proteína recombinante de <i>T. gondii</i> MIC3 para pesquisa de anticorpos IgG totais e suas subclasses. ....	62
Tabela 11. Frequência de resultados da sorologia dos recém-nascidos em relação à sorologia das mães para IgG3 anti- <i>T. gondii</i> em ELISA utilizando antígeno total de <i>T. gondii</i> . ....	63
Tabela 12. Medidas estatísticas do cálculo do teste de McNemar para resultado da sorologia dos recém-nascidos em relação à sorologia das mães através do teste de ELISA para pesquisa de IgG e suas subclasses anti- <i>T. gondii</i> utilizando STAg.....	64
Tabela 13. Comparação das medidas estatísticas dos índices de reatividade de anticorpos IgG e subclasses anti- <i>T. gondii</i> dos recém-nascidos e suas mães no teste de ELISA utilizando antígenos totais de <i>T. gondii</i> .....	68
Tabela 14. Associação entre os resultados de ELISA utilizando três antígenos distintos para pesquisa de IgG e subclasses e o diagnóstico clínico de lesão ocular em crianças com toxoplasmose congênita.....	70

Tabela 15. Associação entre os resultados de ELISA para pesquisa de subclasses de IgG utilizando proteínas totais e recombinantes de *T. gondii* e a avaliação clínica auditiva em crianças com toxoplasmose congênita..... 82

Tabela 16. Associação entre os resultados de ELISA para pesquisa de subclasses de IgG utilizando proteínas totais e recombinantes de *T. gondii* e o diagnóstico de alterações neurológicas em crianças com toxoplasmose congênita ..... 89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Alteração neurológica
C+M-	Crianças positivas com mães negativas
C-M+	Crianças negativas com mães positivas
DA	Déficit auditivo
EDTA	Ethylenediamine-tetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunossorbent assay
GST	Glutathione-S-transferase
IC95%	Intervalo de confiança 95%
IR	Índice de reatividade
LA	Lesão ocular ativa
LAC	Lesão ocular ativa e cicatrizada
LC	Lesão ocular cicatrizada
LRN	Likelihood ratio negative
LRP	Likelihood ratio positive
NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisas em Apoio Diagnóstico
OPD	<i>o</i> -phenilenodiamino
PBS	Phosphate buffered saline
PETN	Programa Estadual de Triagem Neonatal
rMIC3	Proteína recombinante MIC3
rSAG1	Proteína recombinante SAG1
S/N	Razão signal-to-noise
SAN	Sem alteração neurológica
SCA	Sem comprometimento auditivo
SL	Sem lesões
STAg	Antígenos solúveis de <i>Toxoplasma</i>

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* possui importância médica e veterinária, sendo um patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos e fetos de mães recentemente infectadas. Entre novembro/2006 e maio/2007, foram identificados 220 recém-nascidos positivos para IgM anti-*T. gondii* e suas respectivas mães entre 146.307 crianças estudadas, participantes do Programa Estadual de Triagem Neonatal em Minas Gerais. A toxoplasmose foi confirmada em 190 crianças apresentando anticorpos IgG persistentes até o 12º mês de vida, enquanto 45 tiveram o diagnóstico de toxoplasmose congênita descartado. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer uma comparação entre os resultados do teste de ELISA destes recém-nascidos com toxoplasmose congênita, quando utilizados antígenos solúveis (STAg) e recombinantes (rSAG1 e rMIC3) de *T. gondii*, associando as subclasses de IgG aos sinais clínicos encontrados nos mesmos, além de comparar a sorologia das mães e dos recém-nascidos. Foram avaliadas 175 crianças dentre as 190 com toxoplasmose congênita confirmada e 42 dentre as 45 com diagnóstico negativo. As proporções de amostras reativas de recém-nascidos infectados e aqueles não-infectados foram distintas ao realizar ELISA utilizando antígenos recombinantes. Todos os antígenos testados apresentaram alta sensibilidade e baixa especificidade para detectar IgG total e IgG1 anti-*T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita e baixa sensibilidade e alta especificidade para detectar IgG3 e IgG4. Diferença na proporção entre recém-nascidos infectados com mães não-infectadas e recém-nascidos não-infectados com mães infectadas foi observada, demonstrando a produção de anticorpos anti-*T. gondii* pelo feto infectado durante a gestação. Maior chance de se detectar IgG total anti-*T. gondii* pelo teste de ELISA em crianças sem lesões oculares quando comparadas com crianças com lesões ativas e cicatrizadas foi observada, enquanto a detecção de IgG2 e IgG4 anti-*T. gondii* relacionou-se com lesão ocular, quando comparada com crianças sem lesões. Relação entre o ELISA e casos de alterações neurológicas foi observada para IgG2 e IgG4 anti-*T. gondii*, enquanto IgG3 foi relacionada com crianças sem alterações neurológicas. A partir desses resultados, pode-se afirmar que antígenos recombinantes, em conjunto com a pesquisa de subclasses de anticorpos IgG são importantes ferramentas diagnósticas indiretas capazes de prever as possíveis alterações encontradas em recém-nascidos com toxoplasmose congênita.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* has medical and veterinary importance, being an opportunistic pathogen in immunocompromised patients and fetuses of mothers recently infected. From November/2006 to May/2007 220 newborns positive for IgM anti-*T. gondii* and their mothers were identified from 146,307 screened babies, participants of the Newborn Screening State Program in Minas Gerais. Toxoplasmosis was confirmed in 190 children with persistence of IgG antibody until the 12th month of life, while 45 had congenital toxoplasmosis discarded. The aim of this study was to establish a comparison between the results of the ELISA test in newborns with congenital toxoplasmosis when *T. gondii* soluble antigens (STAg) and recombinants (rSAG1 and rMIC3) were employed, comparing serology of mothers and their newborns. In addition, it was studied the association of IgG subclasses and clinical signs. One hundred seventy five children among the 190 with confirmed congenital toxoplasmosis and 42 among the 45 with negative diagnosis were evaluated. The proportion of reactive samples of newborns infected and uninfected ones were different when performing ELISA using recombinant antigens. All the antigens showed high sensitivity and low specificity for detecting total IgG and IgG1 anti-*T. gondii* in children with congenital toxoplasmosis and low sensitivity and high specificity to detect IgG3 and IgG4. Difference in the proportion of newborn infected with non-infected mothers and newborns infected with non-infected mothers was observed, demonstrating the production of anti-*T. gondii* by infected fetus during pregnancy. It was observed greater chance to detect total IgG anti-*T. gondii* by ELISA in children without ocular lesions when compared with children with active and cicatrized lesions, while detection of IgG2 and IgG4 anti-*T. gondii* was related to ocular lesion when compared with children without damage. Relationship between ELISA and cases of neurological disorders was observed for IgG2 and IgG4 anti-*T. gondii*, while IgG3 was related to children with no neurological deficits. Based on these results, it can be affirmed that recombinant antigens in conjunction with subclasses of IgG antibodies detection are important indirect diagnostic tools capable of predicting the potential alterations found in newborns with congenital toxoplasmosis.



# **1. INTRODUÇÃO**

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial causada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário apicomplexo intracelular de ciclo de vida heteroxênico, capaz de infectar uma ampla variedade de vertebrados de sangue quente e até 30% da população mundial humana (TENTER *et al.*, 2000).

Este protozoário é de grande importância médica e veterinária por provocar abortamento ou doenças congênitas em seus hospedeiros intermediários, sendo um patógeno oportunista de pacientes imunocomprometidos e fetos em mães recentemente infectadas.

Em hospedeiros imunocompetentes a infecção pode não se manifestar e produzir uma proteção duradoura para a vida toda, prevenindo a transmissão do parasito às gerações subsequentes (TENTER *et al.*, 2000). Porém se a infecção ocorrer no período gestacional, *T. gondii* pode ser transmitido ao feto causando lesões inflamatórias, as quais podem resultar em danos neurológicos e oftalmológicos (PETERSEN, 2007).

Um importante passo para o diagnóstico da toxoplasmose congênita e a determinação da data do início da infecção é o monitoramento da sua resposta imune (RORMAN *et al.*, 2006). Para isso, testes sorológicos se tornam ferramentas valiosas, sendo que diversas provas são importantes na detecção de anticorpos (PINON *et al.*, 2001; RORMAN *et al.*, 2006).

Após o nascimento, o recém-nascido de mãe infectada por *T. gondii* também deve ser submetido aos testes sorológicos. Porém, a presença de anticorpos circulantes de origem materna no neonato pode interferir no correto diagnóstico no primeiro mês de vida, sendo necessária a repetição periódica dos testes até um ano de vida (PINON *et al.*, 2001; ALTCHER *et al.*, 2006; RORMAN *et al.*, 2006). Quanto mais precocemente for o diagnóstico de crianças com toxoplasmose congênita, mais rápido será o início do

tratamento e mais favorável será o prognóstico da doença, quando comparadas à crianças não tratadas (PINON *et al.*, 2001; ALTCHEH *et al.*, 2006).

O uso de antígenos recombinantes para utilização em testes sorológicos apresenta várias vantagens em relação aos antígenos totais (LI *et al.*, 2000; ALTCHEH *et al.*, 2006), reagindo preferencialmente com anticorpos IgG de indivíduos com infecção aguda.

Além disso, CORREA *et al.* (2007) sugerem que as subclasses de anticorpos IgG nos indivíduos infectados também podem indicar sobre a origem dos mesmos (maternos ou não), e sobre o tipo de resposta imune celular e as possíveis alterações patológicas provocadas pela infecção por *T. gondii*.

Um inquérito para toxoplasmose inserido no projeto intitulado “TRIAGEM NEONATAL PARA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS” conduzido pelo grupo de pesquisa *UFMG Grupo Brasileiro de Toxoplasmose Congênita* foi realizado entre novembro de 2006 e maio de 2007, sendo que amostras de plasma de recém-nascidos com suspeita da infecção por *T. gondii* foram coletadas com o objetivo de avaliar o impacto da toxoplasmose congênita em Minas Gerais.

O presente trabalho pretende estabelecer uma comparação entre os resultados do teste de ELISA destas crianças, quando utilizados antígenos totais e recombinantes de *Toxoplasma gondii*, além de correlacionar as subclasses de IgG e os sinais clínicos encontrados nas mesmas.

Até o momento não há trabalhos relacionando o diagnóstico sorológico de subclasses de IgG utilizando proteínas específicas de *T. gondii* com as alterações clínicas. A hipótese é de que os sinais clínicos e possíveis lesões associadas à toxoplasmose congênita podem estar associados ao perfil de IgG e suas subclasses,

utilizando antígenos recombinantes específicos, sendo uma nova estratégia para o diagnóstico e tratamento precoce da infecção.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

A toxoplasmose é uma doença infecciosa de grande importância médica e veterinária, sendo uma zoonose que tem como agente etiológico o protozoário apicomplexo *Toxoplasma gondii*. Este parasito pode infectar animais de sangue quente (incluindo os humanos), sendo responsável por abortamentos e doenças congênitas em seus hospedeiros intermediários (TENTER *et al.*, 2000; SUKTHANA, 2008).

Taxonomicamente (NICOLLE & MANCEAUX, 1909), *T. gondii* é classificado como:

Sub-reino: Protozoa

Filo: Apicomplexa

Classe: Conoidasida

Sub-Classe: Coccidia

Ordem: Eimeriida

Família: Sarcocistidae

Gênero: *Toxoplasma*

Espécie: *Toxoplasma gondii*

Os primeiros relatos de identificação do parasito foram realizados em 1908 por Nicolle & Manceaux na Tunísia em roedores silvestres africanos, diferenciando-os de protozoários do gênero *Leishmania*, e sendo introduzido um ano mais tarde um novo gênero (*Toxoplasma*), e *T. gondii* a espécie do gênero (DUBEY *et al.*, 1970; DUBEY, 2008; SUKTHANA, 2008). Simultaneamente, SPLENDORE (1908) descreveu o mesmo parasito em coelhos no Brasil.

O primeiro caso de toxoplasmose humana foi descrito em 1923 em uma criança de 11 anos de idade que apresentava hidrocefalia e microftalmia (SUKTHANA, 2008).

Em 1937 *T. gondii* foi reconhecido como o agente causador de encefalomielite em crianças recém-nascidas, sendo que cinco anos mais tarde comprovou-se a sua transmissão vertical em humanos (TENTER *et al.* 2000).

Apesar de vários estudos terem sido realizados desde o início do século XX, somente na década de 1960 o ciclo biológico do parasito foi elucidado, ao demonstrar estágios infecciosos de *T. gondii* nas fezes de gatos, e que estes poderiam transmiti-los a hospedeiros intermediários (DUBEY *et al.* 1970).

## 2.1 Biologia

*T. gondii* apresenta ciclo de vida facultativamente heteroxênico: os hospedeiros intermediários são provavelmente todos os animais de sangue quente, incluindo a maioria dos animais de produção e os humanos. Os hospedeiros definitivos são os membros da família Felidae (DUBEY *et al.* 1970; LÜDER *et al.* 2001; SUKTHANA, 2008). Pode ser encontrado em três estágios distintos: taquizoítos, bradizoítos (contidos em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos) (DUBEY *et al.*, 1970; DUBEY *et al.*, 1998; DUBEY, 2004; MONTOYA & LIESENFELD, 2004).

No hospedeiro intermediário os taquizoítos sofrem desenvolvimento assexuado primeiramente por multiplicação rápida, podendo ser encontrados em praticamente todos os tecidos, incluindo sistema nervoso central, músculos cardíacos e esqueléticos, olhos e placenta (DUBEY *et al.*,1970; DUBEY *et al.*, 1998; MONTOYA & LIESENFELD, 2004). Apresentam-se sob a forma ovóide ou de meia-lua de aproximadamente 2x6µm de comprimento e penetram ativamente nas células hospedeiras devido a estruturas presentes no seu complexo apical, formando um

vacúolo parasitóforo. Dentro destes, os taquizoítos multiplicam-se por endodiogenia até romperem as células hospedeiras, ganhando a corrente sanguínea e invadindo novas células (DUBEY *et al.*, 1970; DUBEY *et al.*, 1998; DUBEY, 2004).

Alguns desses taquizoítos iniciam uma segunda fase de desenvolvimento como bradizoítos, concomitante ao desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro formando o cisto tecidual (MONTROYA & LIESENFELD, 2004). Os cistos teciduais apresentam parede elástica (<0,5 µm de espessura), com tamanho variando de 5 a 70 µm de diâmetro e podem conter centenas de bradizoítos, os quais são morfologicamente semelhantes aos taquizoítos, multiplicando-se lentamente por endodiogenia e persistindo por toda a vida do hospedeiro (DUBEY, 2004; MONTROYA & LIESENFELD, 2004). São encontrados principalmente no sistema nervoso central e nos músculos esqueléticos e cardíacos, sendo que alguns estudos mostram a presença de cistos teciduais também em pulmão, fígado e rins (ESTEBAN-REDONDO *et al.*, 1999).

Ao serem ingeridos pelos hospedeiros definitivos, os bradizoítos iniciam outra fase assexuada de multiplicação, primeiramente por endodiogenia, seguida de uma fase de endopoligenia nas células epiteliais do intestino delgado (DUBEY, 2008). Depois de repetidas multiplicações, inicia-se a fase sexuada por gamogonia, formando os oocistos. Estes são liberados não-esporulados nas fezes do animal com diâmetro de 10x12 µm, sofrendo o processo de esporogonia no ambiente. Esta fase leva ao desenvolvimento de oocistos esporulados contendo dois esporocistos elipsoidais com quatro esporozoítos cada, os quais se tornam infectantes aos seus hospedeiros intermediários (DUBEY *et al.*, 1998; MONTROYA & LIESENFELD, 2004).

Todos os três estágios são infectantes tanto para os hospedeiros intermediários, como para os hospedeiros definitivos, os quais adquirem toxoplasmose principalmente através da transmissão horizontal – ingestão de oocistos esporulados no ambiente;



transmissão horizontal por ingestão de cistos teciduais contidos em carnes ou vísceras cruas ou mal cozidas de hospedeiros intermediários; ou transmissão vertical de taquizoítos (via transplacentária). Em alguns hospedeiros os taquizoítos podem ainda ser transmitidos no leite, da mãe para a prole (TENTER *et al.* 2000; DUBEY, 2004; DUBEY, 2009).

Taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos são semelhantes estruturalmente, possuindo, porém, diferenças nas suas diversas organelas as quais desempenham papéis fundamentais nos processos de interação com a célula hospedeira, movimentação, adesão e invasão (DUBEY *et al.*, 1998). Nesses processos estão envolvidos os antígenos de superfície (SAG), e proteínas presentes em organelas do complexo apical, como as proteínas de micronemas (MIC), proteínas de roptrias (ROP e RON) e proteínas de grânulos densos (GRA) (ISMAEL *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2008; HOLEC-GAŚSIOR & KUR, 2010).

SAGs (*surface antigens*) são proteínas ancoradas na superfície celular de *T. gondii* por âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) e funcionam como ligantes que facilitam a adesão do parasito à célula hospedeira (CHARLES *et al.*, 2007). SAG1 (30 kDa) é a proteína predominante na superfície de taquizoítos de *T. gondii*, já sendo utilizada em vários testes diagnósticos (BUFFOLANO *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2008) e em ensaios vacinais (BHOPALE *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2008).

As proteínas do micronema estão envolvidas na adesão e invasão de *T. gondii* na célula hospedeira. Existem várias proteínas de micronemas descritas, possuindo domínios integrina-like, trombospondina-like, fator de crescimento epidermal-like e lectina-like, semelhantes às proteínas adesivas encontrada em vertebrados (BEGHETTO *et al.*, 2005). MIC3 (90kDa) é uma potente adesina presente em todos os estágios infecciosos de *T. gondii*, tendo sido usada também em testes diagnósticos

(BUFFOLANO *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2008) e sendo candidata a compor uma vacina contra toxoplasmose (ISMAEL *et al.*, 2003; JONGERT *et al.*, 2008).

As roptrias são organelas em forma de bastão encontradas na região anterior de *T. gondii* apresentando proteínas com atividade enzimática (proteíno-quinases, fosfatases e proteases) em número aproximado de 30 (DUBEY *et al.*, 1998). As proteínas de roptrias são encontradas tanto no gargalo (proteínas RON) como no bulbo (proteínas ROP) destas organelas, e são liberadas durante a invasão da célula hospedeira. Seu conteúdo está envolvido na penetração do parasito e formação do vacúolo parasitóforo na célula hospedeira (DUBEY *et al.*, 1998).

Os grânulos densos são organelas envolvidas na maturação do vacúolo parasitóforo, caracterizadas por nanotubos membranosos (DUBEY *et al.*, 1998; HOLEC-GĄSIOR & KUR, 2010). As proteínas de grânulos densos (GRA) são as principais porções de antígenos excretórios/secretórios de *T. gondii*, estando associadas à construção da rede membranosa intravacuolar que permite a interação do parasito com a célula hospedeira (PRIGIONE *et al.*, 2000).

A maioria dos isolados de *T. gondii* está englobada em três tipos de linhagens clonais (I, II e III), as quais, apesar de apresentarem menos de 1% de diferença ao nível genômico, apresentam níveis de virulência distintos (ZHOU *et al.*, 2009). Estes isolados já foram coletados de amostras humanas (predominantemente do tipo I) e carnes suínas, ovinas e de frango da América do Norte e Europa, nos quais se encontram com frequência os tipos II e III (DUBEY *et al.*, 2002; AJZENBERG *et al.*, 2004).

No hemisfério norte, a linhagem II é mais prevalente em animais e humanos, sendo que o tipo I é pouco encontrado em animais de criação, apesar de cepas do tipo I serem frequentemente encontradas em pacientes imunocomprometidos (KHAN *et al.*, 2005). Atualmente é reconhecido que os isolados obtidos no Brasil são

predominantemente recombinantes do tipo I/III, o que não é usual em isolados obtidos na América do Norte e Europa (FERREIRA *et al.*, 2006). Em nosso meio são raros os isolados do Tipo II (KHAN *et al.* 2006; DUBEY & SU, 2009).

## 2.2 Hospedeiros

Infecções latentes com *T. gondii* são comuns em gatos domésticos e selvagens em todo o mundo (LUKEŠOVÁ & LITERÁK, 1998). Tem sido relatado que pelo menos 17 espécies de felinos selvagens disseminam oocistos de *T. gondii*: gatos selvagens europeus e africanos, lince, leopardo, tigre de Bengala, gato-de-pallas, onça pintada, gato de Iriomote, jaguatirica, jaguarundi, gato do mato, puma, tigre, leão e leopardo africano (LUKEŠOVÁ & LITERÁK, 1998; RAMOS SILVA *et al.*, 2001; DEMAR *et al.*, 2008).

O gato doméstico é o único animal domiciliado apontado como hospedeiro definitivo para *T. gondii* (DUBEY, 1996). Os felídeos podem se infectar ingerindo oocistos do ambiente ou ingerindo cistos teciduais de hospedeiros intermediários – quando alimentados com restos de alimentos contendo carne ou vísceras de animais de produção ou de caça, ou quando são permitidos caçarem pequenos mamíferos ou pássaros infectados (MEIRELES *et al.*, 2004; DE CRAEYE *et al.*, 2008). Dependendo da espécie hospedeira, a área geográfica e a estação do ano, até 73% dos pequenos roedores e até 71% dos pássaros silvestres podem estar infectados com *T. gondii* (SUKTHANA, 2006).

Após infecção primária, gatos domésticos podem eliminar grande quantidade de oocistos, colocando em risco de infecção pessoas com as quais mantêm contato (DE CRAEYE *et al.*, 2008).

Os gatos geralmente disseminam grandes quantidades de oocistos após uma infecção primária por até duas semanas. Uma segunda disseminação somente ocorre nos casos de queda da imunidade desses animais (DUBEY, 1996). Em gatos domésticos, anticorpos para *T. gondii* podem ser detectados em até 74% da população adulta, dependendo do tipo de alimentação e se são mantidos dentro ou fora de casa (TENTER *et al.*, 2000; SUKTHANA, 2006; DE CRAEYE *et al.*, 2008). As soroprevalências são maiores em gatos de rua e em gatos selvagens quando comparados com gatos que vivem em ambiente doméstico, já que estes geralmente ingerem alimentos industrializados, reduzindo o risco de infecção (MEIRELES *et al.*, 2004; MIRÓ *et al.*, 2004). Por isso, os gatos de rua têm sido apontados como potenciais sentinelas da contaminação ambiental por *T. gondii* em áreas urbanas, estando expostos a todas as formas infectantes do parasito (MEIRELES *et al.*, 2004).

Praticamente todos os animais de sangue quente podem ser considerados hospedeiros intermediários, susceptíveis aos oocistos esporulados liberados pelos felídeos, abrigando a fase assexuada do ciclo do *T. gondii*. O primeiro caso de toxoplasmose em animais domésticos foi relatado em 1910 na Itália em um cão com quatro meses de idade que morreu com quadro de toxoplasmose aguda (DUBEY, 2008).

Evidência de infecção natural com *T. gondii* tem sido relatada em ovinos, caprinos, cães, bovinos, cavalos, suínos, camundongos, aves, cangurus e mamíferos marinhos (ESTEBAN-REDONDO *et al.*, 1999; TENTER *et al.*, 2000; DUBEY, 2009).

A toxoplasmose é considerada de grande importância em ovinos, caprinos e suínos devido às perdas reprodutivas consideráveis em criações onde a doença está instalada (DUBEY, 2008). Repetições de cio, abortamentos, gastos com serviços veterinários e descarte de animais positivos em grandes rebanhos contribuem para o grande impacto econômico causado (DUBEY, 2008).

O consumo de carne suína infectada é apontado como uma das principais fontes de infecção em humanos (DUBEY, 2008). Porém, com a mudança no manejo em granjas altamente tecnificadas e o processamento da carne suína, a prevalência de toxoplasmose nesses animais vem diminuindo nas últimas décadas (DUBEY, 2009).

Em 1988 um novo parasita semelhante ao *T. gondii*, foi reconhecido e classificado como *Neospora caninum*, agente causador de abortamento em bovinos e alterações neurológicas em equinos, tendo o cão como hospedeiro definitivo (DUBEY, 1988; DUBEY & LINDSAY, 1996; MARSH *et al.*, 1996). O que se sabe hoje é que bovinos e equinos são resistentes à infecção por *T. gondii*, não sendo importantes epidemiologicamente na transmissão da toxoplasmose (DUBEY, 2008).

### **2.3 Fontes de Infecção**

Os taquizoítos desempenham o principal papel na transmissão vertical da toxoplasmose. Porém eles são muito sensíveis às condições ambientais e morrem rapidamente fora do hospedeiro. Por isso acredita-se que a transmissão horizontal de taquizoítos não é epidemiologicamente importante (TENTER *et al.*, 2000).

A possibilidade de toxoplasmose grave em pacientes receptores de transplantes de coração, rins, fígado e medula óssea tem sido relatada (TENTER *et al.*, 2000; DEROUIN & PELLOUX, 2008). Porém, o risco de transmissão é relativamente maior em doadores de órgão, quando comparado ao risco de transmissão por doadores de células-tronco hematopoiéticas, estando relacionado à presença de taquizoítos no sangue ou tecido do doador na fase inicial da infecção, ou à reativação da infecção, resultado do rompimento de cistos presentes no órgão doador (DEROUIN & PELLOUX, 2008).

Taquizoítos podem ocasionalmente resistir por até duas horas em solução de pepsina, sendo que altas doses orais do parasito podem resultar em infecção de gatos e camundongos (DUBEY, 1998), o que demonstra que a sua ingestão através de alimentos pode ser uma provável fonte de infecção. Taquizoítos têm sido encontrados no leite de vários hospedeiros intermediários, incluindo ovelhas, cabras e vacas, porém, a toxoplasmose aguda é associada apenas ao consumo de leite não-pasteurizado de cabra (CHIARI & NEVES, 1984).

Carne de animais de produção contendo cistos teciduais de *T. gondii* é uma importante fonte de infecção (BONAMETTI *et al.*, 1997; DUBEY, 2004; EL-NAWAWI *et al.*, 2008; DORNY *et al.*, 2009). São freqüentemente encontrados em tecidos de galinha caipira, suínos, ovelhas e cabras infectados, e menos freqüentemente em aves de produção, bovinos, coelhos, cães e cavalos infectados (ESTEBAN-REDONDO *et al.*, 1999; EL-NAWAWI *et al.*, 2008; DORNY *et al.*, 2009; DUBEY, 2009).

É possível reduzir significativamente o risco de infecção de toxoplasmose ao se usar manejo intensivo com medidas adequadas de higiene, confinamento e prevenção. Essas medidas incluem manter animais produtores de carne confinados durante toda a criação; manter os galpões livres de roedores, pássaros e insetos; alimentar os animais com rações esterilizadas, e controlar o acesso aos galpões e armazéns de alimentos (não permitindo a entrada de animais) (TENTER *et al.*, 2000; DUBEY, 2009).

Cistos teciduais na carne são destruídos pelo calor a 67° C por 10 minutos, tratamento com baixas temperaturas (-20°C por 24 horas), e por procedimentos comerciais de cura com salga e defumação (DUBEY, 2004; EL-NAWAWI *et al.*, 2008). Para prevenir transmissão horizontal de *T. gondii* via alimentos, a carne e outras partes comestíveis de animais não devem ser consumidas cruas ou mal cozidas, devendo ser

cozidas completamente antes do seu consumo (DUBEY, 2004; EL-SAWAWI *et al.*, 2008). Além disso, é essencial que medidas preventivas para reduzir o risco de transmissão horizontal pelos cistos teciduais incluam altos padrões de higiene na cozinha, lavando-se as mãos e todos os utensílios usados para a preparação de carnes cruas ou outros alimentos com água quente e sabão (TENTER *et al.*, 2000; DUBEY, 2004).

Alguns estudos apontam a importância da transmissão de *T. gondii* pela água, relatando surtos relacionados a contaminações de grandes reservatórios de água devido à eliminação de oocistos por gatos ou outros felídeos selvagens circulantes nas proximidades das instalações (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003; DUBEY, 2004; MOURA *et al.*, 2006).

Várias medidas preventivas podem reduzir o risco de transmissão horizontal de oocistos. Proprietários de gatos pertencentes aos grupos de risco (mulheres gestantes não-imunes e pacientes imunocomprometidos) devem examinar seus gatos em relação à infecção com *T. gondii* - uma sorologia negativa sugere que o gato não foi exposto à toxoplasmose, e ainda está susceptível à infecção (HILL & DUBEY, 2002). Gatos de proprietários incluídos no grupo de risco deveriam ser alimentados com rações secas, enlatadas ou alimentos cozidos, além de serem privados de caçar a fim de evitar a infecção primária (JONES & DUBEY, 2009). Além disso, o ambiente do gato deveria ser controlado em relação aos potenciais hospedeiros intermediários, tais como roedores, assim como os hospedeiros transportadores como baratas e outros invertebrados (HILL & DUBEY, 2002). Em todos os casos, as fezes dos gatos devem ser removidas diariamente do ambiente doméstico. As caixas de areia e todos os itens que podem ter contato com as fezes do animal devem ser limpos completamente com

água quente (>70° C) usando-se luvas, mas preferencialmente não por indivíduos imunocomprometidos ou gestantes (TENTER *et al.*, 2000).

## 2.4 Sinais Clínicos

Economicamente, a toxoplasmose é considerada uma importante infecção em animais, causando também sérios problemas nos seres humanos. Porém na maioria dos casos a infecção por *T. gondii* é assintomática, persistindo durante toda a vida do hospedeiro, sem provocar lesões (MONTROYA & ROSSO, 2005; ELSHEIKHA, 2008). Mesmo as infecções sintomáticas raramente resultam em uma doença sistêmica (PINARD *et al.*, 2003). No entanto, a toxoplasmose deve ser considerada importante em duas populações: pacientes imunocomprometidos e fetos de mulheres que adquiriram a infecção durante a gestação.

Indivíduos imunocomprometidos (pacientes infectados pelo vírus HIV, pacientes que sofreram transplante de órgãos e pacientes em tratamento quimioterápico) infectados com *T. gondii* podem desenvolver lesões graves, resultado de uma infecção aguda ou de reativação de uma infecção latente (PINARD *et al.*, 2003). As principais alterações clínicas são encefalite, hepatite, pneumonia e retinocoroidite (ALTCHEH *et al.*, 2006; ELSHEIKHA, 2008).

Uma infecção materna aguda durante a gestação pode levar a transmissão vertical do parasito e, conseqüentemente, infecção do feto. O risco de infecção fetal depende da idade gestacional da mãe, da competência imunológica da mesma durante a parasitemia, a carga parasitária e a virulência da cepa (RORMAN *et al.*, 2006). Infecções adquiridas durante o primeiro trimestre de gestação resultam em 10% a 25% de casos de toxoplasmose congênita, enquanto que no segundo e terceiro trimestre a



incidência de infecção fetal varia de 30% a 54% e 60% a 65%, respectivamente (MONTROYA & ROSSO, 2005; RORMAN *et al.*, 2006). Nestes casos, mães infectadas durante o início da gestação podem apresentar abortos ou morte fetal, ou levar ao nascimento de crianças prematuras debilitadas, com deficiência física e/ou mental, hidrocefalia e cegueira (RORMAN *et al.*, 2006; ELSHEIKHA, 2008).

Nos recém-nascidos, as manifestações clínicas podem variar e se desenvolver em diferentes períodos, sendo que na maioria dos casos podem não aparecer (RORMAN *et al.*, 2006). No entanto, em casos sintomáticos, pode-se observar linfadenopatia generalizada, hepatomegalia, esplenomegalia, hiperbilirrubinemia, anemia e trombocitopenia, além da tríade clássica de Sabin: retinocoroidite, hidrocefalia e calcificação cerebral (RORMAN *et al.*, 2006). GILBERT *et al.* (2008) apontam uma maior frequência e severidade das lesões oculares em recém-nascidos no Brasil quando comparado à Europa, o que os autores atribuem principalmente à exposição a cepas mais virulentas.

Recentemente, VASCONCELOS-SANTOS *et al* (2009) observaram que 79,8% de crianças infectadas por *T. gondii*, identificadas em um estudo de triagem neonatal em Minas Gerais, apresentavam lesões de retina consistentes com toxoplasmose congênita.

Em outro estudo realizado em Belo Horizonte, observou-se que cerca de 20% das crianças participantes do Programa de Triagem Neonatal em Minas Gerais com diagnóstico de toxoplasmose congênita apresentavam déficit auditivo. Estes dados sugerem que a infecção por *Toxoplasma gondii* no recém nascido seja um fator de risco para a deficiência auditiva, sendo que o diagnóstico e tratamento precoces podem ser associados a um melhor prognóstico (ANDRADE *et al.*, 2008).

## **2.5 Epidemiologia**

A toxoplasmose apresenta ampla distribuição mundial, sendo uma infecção muito comum em humanos e animais (ELSHEIKHA, 2008). A sua prevalência varia muito dependendo da região estudada, o que pode ser explicado devido a hábitos alimentares, nível sócio-econômico, condições ambientais favoráveis à sobrevivência de oocistos, hábitos higiênicos, entre outros (PINARD *et al.*, 2003; MONTOYA & ROSSO, 2005; ELSHEIKHA, 2008; HIGA *et al.*, 2010).

Apesar dos felídeos apresentarem um papel importante na epidemiologia da toxoplasmose por produzirem grandes quantidades de oocistos, não foi demonstrada correlação entre a toxoplasmose humana e a posse de felinos no ambiente doméstico (JONES *et al.*, 2001). Essa grande produção de oocistos, aliada à grande resistência, facilita sua ampla contaminação no ambiente. Os oocistos podem se disseminar no ambiente mecanicamente por moscas, baratas, besouros e minhocas, e sobrevivem por longos períodos em frutas e outros vegetais (DUBEY, 2004).

Em mulheres adultas, a prevalência de positividade pode variar entre 51% e 72% na América Latina, 54% a 77% na África Ocidental, 4% a 39% no sudeste asiático, 58% nos países europeus e 15% na América do Norte (RORMAN *et al.*, 2006).

No Brasil, a prevalência de toxoplasmose varia de acordo com a região estudada. Em um estudo envolvendo 29 municípios do Rio Grande de Sul, foi observado 74,5% de mulheres gestantes com sorologia positiva para *T. gondii*, sendo que 3,4% reativas a IgM (SPALDING *et al.*, 2005). Em um estudo realizado entre agosto de 2004 e maio de 2005 na cidade de Belo Horizonte, observou-se 56,3% de gestantes IgG-positivas para toxoplasmose (CARELLOS *et al.*, 2008). Este resultado apresentou valores similares aos encontrados em gestantes na cidade de Cascavel – Paraná (54,2%) (MIORANZA *et al.*, 2008).

Ao ser realizada uma investigação epidemiológica para toxoplasmose em Campo dos Goitacazes (norte do Rio de Janeiro), observou-se diferentes prevalências dependendo do nível socioeconômico, variando de 23% nas classes mais altas, até 84% na população de baixa renda (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Estima-se que metade dos casos de toxoplasmose nos Estados Unidos deve-se à ingestão de alimentos contaminados (PINARD *et al.*, 2003). Na França, o grande número de pessoas infectadas está relacionado à preferência pelo consumo de carne crua ou mal-passada contaminada com cistos teciduais (SUKTHANA, 2008). A alta prevalência de toxoplasmose encontrada no Brasil em pessoas de baixas condições sócio-econômicas deve-se provavelmente à transmissão pela água contaminada com oocistos (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Em mulheres gestantes, cerca de 3 a 8 crianças a cada 1000 nascidos vivos são infectadas, sendo que variações entre diversas regiões ocorrem devido aos fatores descritos acima – enquanto na França e Bélgica a incidência varia de 2 a 3 casos por 1000 nascidos vivos, nos Estados Unidos a incidência varia de 0,1 a 1 casos por 1000 nascidos vivos (MONTROYA & ROSSO, 2005; RORMAN *et al.*, 2006). No Estado de Minas Gerais foi observado 1 caso para cada 770 nascidos vivos (VASCONCELOS-SANTOS *et al.*, 2009), sendo que em Belo Horizonte um estudo revelou a taxa de 1 caso para cada 1590 nascidos vivos (ANDRADE *et al.*, 2008).

## **2.6 Resposta Imune na Toxoplasmose**

A infecção por *T. gondii* resulta em uma forte resposta Th1 caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Através de

mecanismos efetores das células estimuladas por estas citocinas, associadas à resposta inata, um hospedeiro imunocompetente limita a replicação do parasito e subseqüentes lesões (LÜDER *et al.*, 2001; MONTOYA & LIESENFELD, 2004). Em casos de encefalite provocada por *T. gondii*, a presença de grande quantidade de células dendríticas está correlacionada à severa inflamação local, sendo as principais ativadoras da resposta Th1 (LÜDER *et al.*, 2001).

Cepas de alta virulência também contribuem para a patogenia da infecção, não apenas pela destruição tecidual direta devido à replicação do parasito, mas também ao superestimular a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-18, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico, as quais podem resultar em lesões hepáticas ou morte de camundongos susceptíveis (LÜDER *et al.*, 2001).

A evolução da infecção é resultado de um equilíbrio na produção de citocinas Th1 e Th2. Portanto, uma alteração neste equilíbrio pode resultar na latência ou na patogenicidade da infecção.

Em casos de toxoplasmose congênita estável (títulos de IgG estáveis durante pelo menos um ano), o nível de IFN- $\gamma$  é maior em relação a IL-4. Porém quando a infecção é reativada, o perfil de citocinas Th2 torna-se dominante, responsáveis pela manutenção de anticorpos IgE e susceptibilidade ao *T. gondii* (KAHI *et al.*, 1999; FATOOHI *et al.*, 2002).

A toxoplasmose ocular em pessoas imunocompetentes pode estar atribuída à baixa resposta Th1, enquanto que a toxoplasmose congênita e cerebral em pacientes imunocomprometidos está associada a um perfil predominantemente Th2 (KAHI *et al.*, 1999).

Após duas semanas de infecção, níveis significativos de anticorpos contra diversas proteínas de *T. gondii* já podem ser detectados. Em adultos com toxoplasmose

adquirida, linfócitos T apresentam um perfil predominantemente Th1, o qual protege e limita a infecção. Porém, em crianças com toxoplasmose congênita, este perfil é instável provavelmente devido à infecção *in útero*, a qual induz tolerância no organismo levando a uma dominância Th2 (KAHI *et al.*, 1999). Isto resulta em ruptura de cistos teciduais ou liberação de antígenos do parasito, os quais podem reativar o sistema imune, produzindo uma resposta celular Th2 e humoral com liberação de IgE e IgG (KAHI *et al.*, 1999). A produção de IgA nas mucosas parece proteger o hospedeiro contra reinfecções (MONTROYA & LIESENFELD, 2004).

São poucos os estudos que avaliam a resposta de anticorpos IgG e suas subclasses na toxoplasmose. Em humanos, anticorpos IgG têm sido identificados durante a infecção por *T. gondii*, sendo IgG1 a subclasse predominante que surge inicialmente. Baixos níveis de IgG2 e IgG3 são observados, enquanto anticorpos IgG4 podem não ser detectados (HUSKINSSON *et al.*, 1989).

Em camundongos infectados com cepa de baixa virulência de *T. gondii*, observou-se, na fase aguda, níveis maiores de IgG2b, seguido de IgG2a, IgG3 e IgG1 (equivalentes em humanos a IgG3, IgG1, IgG2 e IgG4, respectivamente) (NGUYEN *et al.*, 1998). Ainda, camundongos com deficiências em células T CD4<sup>+</sup> apresentaram níveis diminuídos de IgG2a associados a maior susceptibilidade ao *T. gondii* (JOHNSON & SAYLES, 2002).

Em humanos, em conjunto com IgG3, anticorpos IgG1 são fortes ativadores da via clássica do complemento, e ligam-se a células natural killers, macrófagos e neutrófilos através de receptores Fc- $\gamma$ , envolvidos na destruição do parasita (HUSKINSSON *et al.*, 1989; CAÑEDO-SOLARES *et al.*, 2008). Em um estudo relacionado à síntese fetal das quatro subclasses de IgG, demonstrou-se que IgG3 e IgG4 podem estar relacionadas aos problemas clínicos, enquanto IgG1 relaciona-se com

proteção a lesões (CAÑEDO-SOLARES *et al.*, 2008). Estes autores sugerem que as subclasses de IgG podem ser marcadores de infecção congênita ou sintomas clínicos.

Este comportamento também é observado em infecções com outros apicomplexos (ANDRIANARIVO *et al.*, 2001; MORAIS *et al.*, 2006; TANGTEERAWATANA *et al.*, 2009).

Em bovinos infectados com *Neospora caninum*, a produção de IgG2 (equivalente à IgG1 humana) é aumentada pela síntese de citocinas Th1, enquanto citocinas do tipo 2 (IL-4) estimulam a produção de anticorpos IgG1 (equivalentes à IgG2 humana) (ANDRIANARIVO *et al.*, 2001).

Em humanos infectados por *Plasmodium falciparum*, baixos níveis de IgG3 podem estar associados à lesões causadas pelo parasito, enquanto altos níveis podem indicar proteção (TANGTEERAWATANA *et al.*, 2009). Ainda, grandes proporções desta subclasse são encontradas em indivíduos submetidos à exposição prolongada de *Plasmodium vivax* (MORAIS *et al.*, 2006).

A maioria dos estudos com antígenos de *T. gondii* envolvidos com a resposta imune compreende pesquisas com proteínas de superfície, proteínas do micronema, antígenos de grânulos densos e antígenos de roptrias (BEGHETTO *et al.*, 2005). As proteínas do micronema (MICs) estão envolvidas predominantemente na resposta de linfócitos B durante a infecção, estando também envolvidas com a manutenção da resposta de linfócitos T-helper. Além disso, pesquisas com antígenos de superfície (SAGs) e de grânulos densos (GRAs) demonstram que estes podem ativar células T CD4+, sendo bastante imunogênicos (BEGHETTO *et al.*, 2005; GUGLIETTA *et al.*, 2007). Além disso, GUGLIETTA *et al.* (2007) afirmam que a resposta ao antígeno recombinante GRA1 aumenta ao longo do tempo de infecção, principalmente em indivíduos com infecção congênita com mais de 4 anos de idade.

## 2.7 Diagnóstico

A toxoplasmose aguda raramente é diagnosticada pela detecção do parasita em tecidos, fluidos corporais ou secreções. A sorologia é o principal método de diagnóstico da toxoplasmose, sendo que, em recém-nascidos, quanto mais precoce for identificado, melhor será o prognóstico das crianças tratadas quando comparadas às não-tratadas (JONES *et al.*, 2001; ALTCHEH *et al.*, 2006).

O objetivo primário de se diagnosticar a toxoplasmose durante a gestação é estabelecer se a infecção ocorreu antes ou durante a concepção, procurando reatividade a anticorpos IgG e IgM (MONTROYA & ROSSO, 2005). Um resultado positivo para IgG e negativo para IgM durante o primeiro trimestre de gestação indica que a infecção materna ocorreu no passado antes da concepção. Porém, um resultado positivo para IgM deveria ser encaminhado para um laboratório de referência para confirmação pois, apesar de sugerir toxoplasmose aguda, não indica necessariamente que ocorreu uma infecção recente (BOBIĆ *et al.*, 1991; MONTROYA & ROSSO, 2005).

Realizado apenas por centros de referência, o teste de Sabin-Feldman ainda é considerado padrão-ouro, identificando Ig totais anti-*T. gondii* (RORMAN *et al.*, 2006). Os testes de ELISA e aglutinação para detecção de anticorpos IgM podem ser considerados indicadores de infecção recente. Outros testes amplamente utilizados são os de imunofluorescência indireta, mais seguro e econômico quando comparado ao teste de Sabin-Feldman, e o teste de avides, o qual pode distinguir anticorpos IgG de baixa avides (infecção recente) e alta avides (infecção crônica), sendo importante quando há somente uma única amostra de soro disponível para se estabelecer o diagnóstico

(ASHBURN *et al.*, 1998; LAPPALAINEN & HEDMAN, 2004; RORMAN *et al.*, 2006).

O diagnóstico pré-natal da toxoplasmose deve ser considerado de grande importância em gestantes. O exame ultra-sonográfico pode muitas vezes ser inespecífico, porém em alguns casos podem-se visualizar calcificações intracranianas, hidrocefalia, microcefalia e dilatação ventricular (MONTROYA & ROSSO, 2005; RORMAN *et al.*, 2006). A inoculação de amostras de líquido amniótico e sangue fetal em camundongos ou em cultura, ou a utilização de técnicas moleculares, podem ser utilizados como diagnóstico definitivo de toxoplasmose ativa (RORMAN *et al.*, 2006; HIGA *et al.*, 2010).

Anticorpos IgG maternos presentes no neonato podem indicar tanto uma infecção recente ou passada na mãe, sendo necessária a sua repetição após 12 meses de vida da criança para confirmação da origem destes anticorpos (neoformados pela criança ou adquiridos passivamente através da placenta) (PINON *et al.*, 1996; MONTROYA & ROSSO, 2005; ALTCHER *et al.*, 2006). Apesar disso, outros anticorpos (IgA, IgM ou IgE) não cruzam a placenta, sendo que ao serem encontrados no recém-nascido, são indicativos de toxoplasmose congênita (PINON *et al.*, 1996; MONTROYA & ROSSO, 2005; ALTCHER *et al.*, 2006). A combinação de testes sorológicos para pesquisa destes anticorpos contribui para o correto diagnóstico pós-natal precoce da toxoplasmose congênita, o que facilita o monitoramento estratégico do tratamento (PINON *et al.*, 1996; ASHBURN, *et al.*, 1998; MONTROYA & ROSSO, 2005).

O teste de Western blotting pode ser uma ferramenta útil para se diferenciar anticorpos maternos e do recém-nascido, porém não é amplamente utilizado devido à



sua complexidade técnica e alto preço (RORMAN *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2010).

O diagnóstico de toxoplasmose congênita pode se tornar complicado se, após o nascimento, a criança não apresentar níveis significantes de IgM e IgA anti-*T. gondii* (PETERSEN, 2007; ROC *et al.*, 2010). Nestes casos, o acompanhamento nos níveis de IgG deve ser realizado até 12 meses de vida, quando os níveis de anticorpos IgG maternos, adquiridos passivamente e presentes no sangue da criança, tiverem diminuído.

Apesar de testes sorológicos apresentarem resultados satisfatórios, alguns kits comerciais podem apresentar resultados variáveis devido à utilização de antígeno de taquizoítos cultivados em camundongos ou em cultura celular, sendo muitos deles não padronizados. Por isso, a produção de reagentes confiáveis pode apresentar altos custos (HISZCZYŃSKA-SAWICKA *et al.*, 2003). O uso de antígenos recombinantes para o diagnóstico de toxoplasmose congênita apresenta vantagens quando comparados com antígenos brutos do parasito. Além de serem de fácil padronização, alguns antígenos de *T. gondii* apresentam elevada reatividade a anticorpos IgG nas fases iniciais de infecção, permitindo a diferenciação das infecções agudas e crônicas (JACOBS *et al.*, 1999; HISZCZYŃSKA-SAWICKA *et al.*, 2003; BUFFOLANO *et al.*, 2005; ALTCHER *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos relatam que anticorpos podem ter reatividades distintas a diferentes antígenos recombinantes, sendo recomendado o uso de uma combinação de tais antígenos. A presença de múltiplos epítomos distintos aumentaria a probabilidade de detectar anticorpos anti-*T. gondii* em diferentes estágios de infecção (LI *et al.*, 2000; PIETKIEWICZ, *et al.*, 2004; BUFFOLANO *et al.*, 2005; BEGHETTO *et al.*, 2006).

ALTCHEH *et al.* (2006) avaliaram três proteínas recombinantes (ROP2, GRA4, e GRA7) de *T. gondii* para pesquisa de IgG em neonatos com toxoplasmose congênita. Em 91% dos casos, anticorpos IgG de crianças infectadas identificaram a proteína rROP2, enquanto 67% das crianças não-infectadas identificaram este recombinante. Para rGRA4, IgG de 86% das crianças infectadas reconheceram a proteína, sendo que 29% das não-infectadas reconheceram. Anticorpos IgG de 56% das crianças reagiram com a proteína rGRA7, enquanto 11% dos neonatos não-infectados reagiram. Houve diferença significativa entre infectados e não-infectados apenas para GRA4 e GRA7.

Outros estudos demonstram que anticorpos IgG reagem com diversas proteínas recombinantes, sendo que anticorpos anti-MIC3 e anti-MIC4 indicam replicação ativa de *T. gondii* (PIETKIEWICZ, *et al.*, 2004; BUFFOLANO *et al.*, 2005). Também se tem demonstrado que recém-nascidos infectados produzem anticorpos IgG2 e IgG3 contra antígenos recombinantes, enquanto níveis significativos de anticorpos IgG1 presentes nestas crianças são de origem materna e transmitidos à criança através da placenta (BUFFOLANO *et al.*, 2005; PETERSEN, 2007). Estas observações poderiam contribuir para a melhoria do diagnóstico da toxoplasmose congênita em neonatos, sendo que CORREA *et al.* (2007) sugerem que as subclasses de IgG encontradas em recém-nascidos poderiam indicar as possíveis alterações patológicas causadas por *T. gondii*.

## **3. OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil da resposta imune humoral em recém-nascidos com toxoplasmose congênita, nascidos de mães infectadas, através do perfil imunológico de imunoglobulinas G, utilizando-se antígenos recombinantes.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar o método de ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-IgG total, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 contra *T. gondii* em crianças, utilizando como antígenos proteínas totais (STAg) e proteínas recombinantes MIC3 (rMIC3) e SAG1 (rSAG1) de *T. gondii* e anticorpos secundários conjugados com biotina.
- Avaliar a sensibilidade relativa e a especificidade relativa dos diferentes testes de ELISA indireto em relação a persistência de IgG após 12 meses de vida em recém-nascidos com toxoplasmose congênita.
- Analisar comparativamente a sorologia das mães e dos recém-nascidos, além dos respectivos índices médios de reatividade, identificando quais subclasses de IgG podem estar relacionadas com a transferência passiva materna de anticorpos e quais podem ser produzidas pelos neonatos.
- Avaliar a associação entre as subclasses de IgG e sinais clínicos observados em recém-nascidos com toxoplasmose congênita, especialmente o comprometimento oftalmológico, déficit auditivo e sinais neurológicos.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 5.1 Pacientes e Banco de dados

Entre novembro de 2006 e maio de 2007, uma parceria entre o Núcleo de Ações e Pesquisas em Apoio Diagnóstico – NUPAD (Faculdade de Medicina/UFMG) e a Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais através do Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN) de Minas Gerais realizou um estudo para avaliar o impacto da toxoplasmose congênita em Minas Gerais. No NUPAD são normalmente atendidos recém-nascidos para triagem neonatal de fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, fibrose cística e doença falciforme (TESTE DO PEZINHO). O inquérito para toxoplasmose está inserido no projeto intitulado “TRIAGEM NEONATAL PARA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS” conduzido pelo grupo de pesquisa *UFMG Grupo Brasileiro de Toxoplasmose Congênita*.

Neste projeto, foram considerados casos de toxoplasmose congênita crianças IgM e/ou IgA positivas para toxoplasmose e persistentemente IgG positivas ao final de 12 meses.

Inicialmente foram realizados testes em eluatos de sangue seco em papel filtro para pesquisa de IgM anti-*T. gondii* (TOXO IgM Q-Preven®, Symbiosis, Leme, Brasil) coletado nos primeiros dias de vida em todos os recém-nascidos participantes do PETN. Aqueles que apresentaram sorologia positiva ou duvidosa, foram submetidos, juntamente com suas respectivas mães, ao teste de ELISA para pesquisa de IgM, IgA e IgG para confirmar o diagnóstico (Enzyme-Linked Fluorometric Assay, ELFA-VIDAS®, BioMérieux SA, Lyon, França).

Foram testadas 146.307 crianças e, destas, 235 apresentaram suspeita de toxoplasmose congênita pelo resultado de IgM anti-*T. gondii* positivo ou duvidoso. Dentre as crianças com resultado positivo/duvidoso para IgM e que realizaram consulta

médica e exames sorológicos confirmatórios, 190 tiveram o diagnóstico de toxoplasmose congênita confirmado e 45 casos apresentaram IgG negativa após 12 meses de vida (VASCONCELOS-SANTOS *et al.*, 2009).

No presente trabalho foram avaliadas 175 crianças dentre as 190 com toxoplasmose congênita confirmada e 42 dentre as 45 com diagnóstico negativo para toxoplasmose (Figura 1).

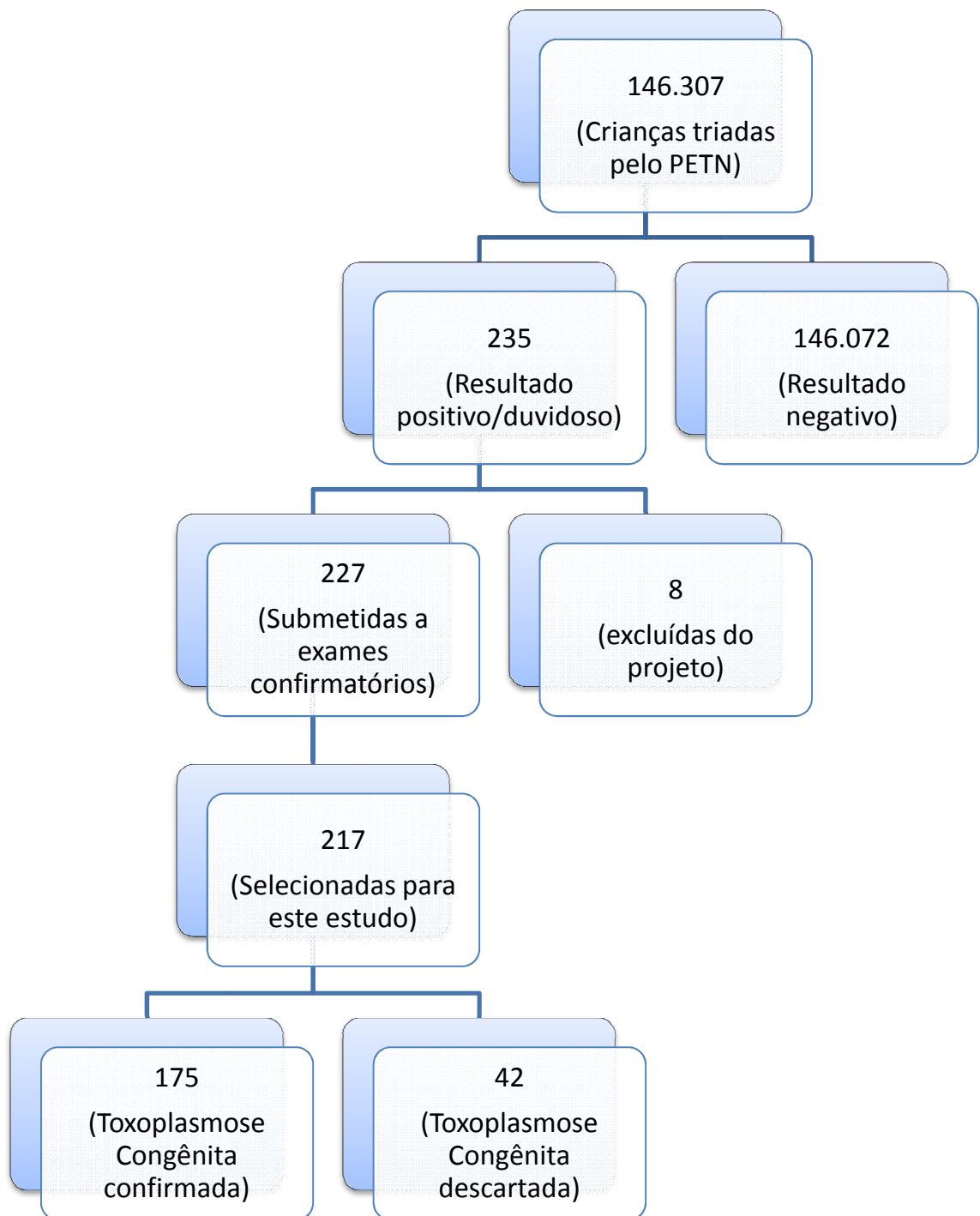


Figura 1. Fluxograma da triagem neonatal para toxoplasmose congênita em Minas Gerais, realizada no período de nov/2006 a mai/2007.



Além disso, todos os 175 recém-nascidos com toxoplasmose congênita (e os 42 controles não infectados) foram submetidos a exames oftalmológicos incluindo fundoscopia para avaliação de integridade da retina e outros exames para observação de possíveis alterações neurológicas e auditivas (Figura 2) no Hospital das Clínicas (HC) da UFMG sob a responsabilidade dos médicos Drs. José Nélio Januário, Gláucia Manzan Queiroz de Andrade, Luciana Macedo e Daniel V. Vasconcelos-Santos.

As crianças infectadas com sinais clínicos oculares foram classificadas da seguinte forma: a. Grupo SL: crianças sem lesões oculares (45 crianças); b. Grupo LA: crianças com retinocoroidite ativa, consistente com toxoplasmose congênita em pelo menos um olho (22 crianças); c. Grupo LC: crianças com retinocoroidite cicatrizada, consistente com toxoplasmose congênita em pelo menos um olho (45 crianças); d. Grupo LAC: crianças simultaneamente com lesões ativas e cicatrizadas (63 crianças).

As crianças infectadas com sinais clínicos neurológicos foram classificadas da seguinte forma: a. Grupo SAN: crianças sem alteração neurológica (136 crianças); b. Grupo AN: crianças com alterações neurológicas, isto é, com calcificações cranianas (20 crianças).

As crianças com sinais clínicos auditivos foram classificadas da seguinte forma (ANDRADE *et al.*, 2008): a. Grupo SCA: crianças sem comprometimento auditivo (69 crianças); b. Grupo DA: crianças com deficiência auditiva, avaliadas por audiometria comportamental, emissões otoacústicas, imitanciometria e audiometria de tronco encefálico (40 crianças).

Os casos confirmados foram submetidos ao tratamento específico durante 12 meses (sulfadiazina + pirimetamina + ácido folínico). Crianças com suspeita da infecção foram submetidas ao mesmo tratamento e à repetição dos testes sorológicos até a confirmação ou exclusão da infecção.

Nenhuma das 42 crianças-controle apresentou sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose.

A partir de todas as informações coletadas neste estudo, foi criado um banco de dados utilizando o programa EXCEL™, que contém informações de todos os recém-nascidos, suas respectivas mães, sinais clínicos encontrados nas crianças, resultados da sorologia e outras informações relevantes ao estudo.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), parecer nº 0298/06.

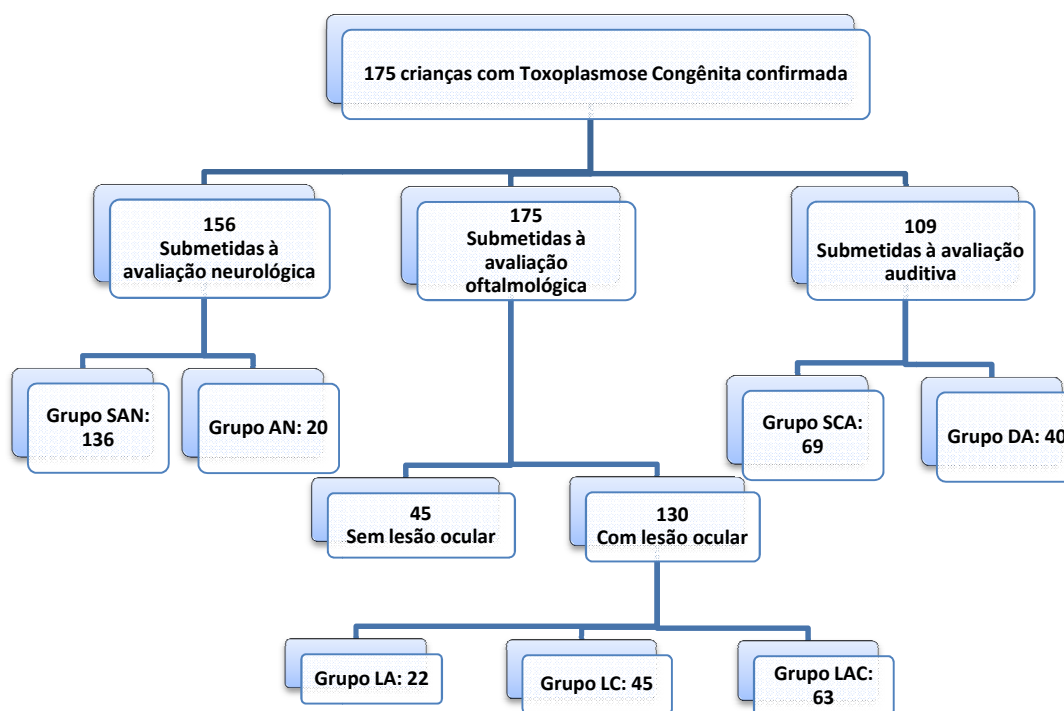


Figura 2. Fluxograma dos exames clínicos realizados nas 175 crianças com toxoplasmose congênita identificadas na triagem neonatal em Minas Gerais no período de novembro de 2006 a maio de 2007. SAN: sem alteração neurológica; AN: com alteração neurológica; SL: sem lesão ocular; LA: retinocoroidite ativa; LC: retinocoroidite cicatrizada; LAC: retinocoroidite ativa e cicatrizada; SCA: sem comprometimento auditivo; DA: déficit auditivo.

## 5.2 Plasmas analisados

A coleta de sangue para este estudo (0,5mL em EDTA) foi realizada em recém-nascidos com a idade média de  $55,6 \pm 16,6$  dias (mediana 56 dias). Neste mesmo dia foram realizados os exames clínicos. Após 24 horas da coleta de sangue, foi iniciado o tratamento. O plasma foi aliquotado e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos testes de ELISA.

Com base no banco de dados criado, os plasmas de todas as 175 crianças consideradas casos de toxoplasmose congênita com anticorpos IgG persistentes até o 12º mês de vida, bem como os plasmas das 42 crianças-controle negativo, foram submetidos no presente trabalho ao teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG e suas subclasses. O plasma das mães coletados no mesmo dia também foi avaliado para pesquisa de anticorpos IgG e suas subclasses contra antígeno total solúvel de *T. gondii*.

## 5.3 Antígenos de *T. gondii*

Para o preparo do antígeno solúvel total de *T. gondii* (STAg) para o ELISA, foram coletados taquizoítos do parasito no exsudato peritoneal de camundongos, previamente inoculados pela via intraperitoneal com a cepa RH de *T. gondii*. Inicialmente este material foi centrifugado por 20 segundos a 300g para retirar células contaminantes do camundongo. O sobrenadante foi lavado por centrifugação (1000g/10 minutos) por duas vezes em PBS pH 7,2 e adicionado 10mL de PBS pH 7,2 ao sedimento resultante. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara

hemocitométrica e a concentração destes acertada para  $1 \times 10^9$  taquizoítos/mL. A suspensão de parasitos foi então processada por ultra-som em 5 ciclos de 40 hertz (em banho de gelo), durante 1 minuto e com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo, sendo o rompimento dos parasitos acompanhados em microscópio óptico. Após a sonicação o material foi centrifugado a  $15000g/4^\circ C$  durante 30 minutos. O sobrenadante (antígeno total) foi então estocado a  $-20^\circ C$  até o uso. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de LOWRY *et al.* (1951). No preparo do antígeno para congelamento não foram utilizados inibidores de proteases, já que pela experiência do laboratório, tem-se demonstrado que a concentração e qualidade das proteínas lisadas de *T. gondii* permanecem estáveis, mesmo após longos períodos à  $-20^\circ C$ .

As proteínas recombinantes utilizadas no presente estudo foram fabricadas pela GenWay® (<http://www.genwaybio.com>), produtos 10-511-248151 (*Toxoplasma gondii* SAG1) e 10-511-248152 (*Toxoplasma gondii* MIC 3), expressas em *Escherichia coli* como proteínas fusionadas (glutathione-S-transferase - GST). Por essa razão, para ambas proteínas, foi necessária a utilização de GST como controle no ELISA. Informações detalhadas sobre as proteínas recombinantes e sobre a concentração da proteína GST fusionada aos antígenos recombinantes não foram disponibilizadas pelo fabricante.

#### **5.4 Teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii***

Todos os experimentos foram realizados em placas de 96 orifícios Maxisorp (NUNC™). Antes do início dos testes, o método de ELISA foi padronizado levando-se em conta a concentração de antígeno, solução de bloqueio, concentração e tempo de bloqueio, diluição do plasma, diluição do anticorpo conjugado com biotina e diluição da

estreptavidina-peroxidase. Os dados absolutos de absorvância a 490nm em duplicata de plasma padrão positivos e negativos usados na padronização foram transformados em média. O “signal-to-noise” (razão S/N), foi calculado através da divisão do valor absoluto médio de absorvância de três plasmas-controle positivos pelo valor absoluto médio de absorvância de três plasmas-controle negativos (RAJASEKARIAH *et al.*, 2001). Foram considerados como ponto ótimo de padronização os valores de S/N mais elevados obtidos nas diferentes concentrações e diluições.

Foram testados como antígeno: STAg produzido no Laboratório de Toxoplasmose (Departamento de Parasitologia/ Instituto de Ciências Biológicas/ UFMG), e as proteínas recombinantes de *T. gondii* rMIC3 e rSAG1 produzidos pela GenWay Biotech Inc.

Além de se testar anticorpos IgG totais anti-*T. gondii*, as subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 também foram pesquisadas. Para isso, foram utilizados anticorpos secundários específicos conjugados com biotina (SIGMA™). A revelação ocorreu em uma primeira etapa com a adição de estreptavidina-peroxidase (SIGMA™), a qual apresenta alta afinidade por biotina, e posteriormente com solução substrato *o*-phenilenodiamino (OPD – SIGMA™).

Placas de 96 orifícios foram sensibilizadas por 20 horas com 100ul/orifício STAg (0,25; 0,5 e 1,0 µg/well) ou rSAG1 e rMIC3 (0,125; 0,25; 0,5µg/well). Após lavagens e bloqueio (leite desnatado, gelatina ou soro fetal bovino – SFB diluídos em PBS pH 7,2 – por 60 ou 120 minutos) os plasmas humanos foram diluídos e adicionados aos orifícios no título ótimo determinado previamente (1:50; 1:100; 1:200 ou 1:400).

Após incubação por 60 minutos e lavagens foi adicionado anticorpo murino monoclonal anti-anticorpo humano marcado com biotina (anti-IgG1, IgG2, IgG3, IgG4

ou IgG total) no título ótimo determinado previamente (1:2500, 1:4000, 1:5000, 1:8000, 1:10000, 1:15000 ou 1:20000). Após 1 hora a 37°C e lavagens, foi adicionada uma solução de streptavidina-peroxidase (SIGMA) diluída 1:4000 ou 1:20000 e incubada por 30 minutos a 37°C. A revelação foi realizada com solução de o-phenilendiamine (OPD) em ácido cítrico 0,1M, utilizando-se como substrato peróxido de hidrogênio. A reação foi desenvolvida no escuro e bloqueada após 20 minutos com 30ul de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. A leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA (BIO-RAD 3550), no qual os resultados foram determinados a partir da diferença entre a densidade óptica a 490nm (comprimento de onda de leitura) e 650nm (comprimento de onda de referência). No caso das leituras obtidas com as duas proteínas recombinantes, foi subtraído o valor em absorbância obtido para cada um dos plasmas contra glutathiona-S-transferase (SIGMA), usada para sensibilizar, em paralelo, orifícios da mesma microplaca.

O “cut off” para o ELISA foi considerado como a média de absorbância de oito amostras de plasma humano negativos para *T. gondii* (para cada um dos isotipos) mais três desvios padrão, testados em cada placa. A média de absorbância dos plasmas testados em duplicata foi dividida pelo valor do “cut off” da placa para determinar o índice de reatividade (IR). Plasmas com valores de IR maiores ou iguais a 1 foram considerados positivos (BUFFOLANO *et al.*, 2005; ALTCHER *et al.*, 2006).

## **5.5 Análise Estatística**

O método tradicional para a confirmação de uma infecção congênita é o acompanhamento sorológico da criança por 12 meses, sendo que após este período observa-se a persistência ou não de IgG específica para *T. gondii*. O declínio dos níveis de IgG nas crianças, após este período indica que houve transferência passiva de

anticorpos maternos, estando as crianças não-infectadas (PETERSEN, 2007; SUKTHANA, 2006). Por isso, no presente trabalho, a determinação da validade do teste de ELISA utilizando-se STAg e as proteínas recombinantes de *T. gondii* rMIC3 e rSAG1 para IgG total foi realizada, utilizando-se como teste de referência o ELISA (kit ELFA-VIDAS para IgG) após 12 meses de vida de cada criança realizado em um laboratório terceirizado pelo NUPAD.

Foram determinados os índices de sensibilidade e especificidade relativas dos testes (Figura 3) e as razões de verossimilhança positivas e negativas e os respectivos intervalos de confiança a 95% dos testes de ELISA utilizando-se o STAg, rMIC3 e rSAG1 para IgG total e suas subclasses.

Anticorpos IgG após 12  
meses de vida  
(Padrão-Ouro)

		PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
Teste	POSITIVO	A	B	A+B
	NEGATIVO	C	D	C+D
	TOTAL	A+C	B+D	A+B+C+D

Sensibilidade= $A/A+C$   
Especificidade= $D/B+D$

**Figura 3. Modelo para avaliação da validade de um teste diagnóstico**

Em seguida, os resultados dos índices de reatividade (IR) foram acrescentados ao banco de dados EXCELL criado previamente, contendo as informações clínicas avaliadas neste trabalho: comprometimento oftalmológico, déficit auditivo e sinais neurológicos.

A associação de cada variável com os resultados do ELISA para todos os antígenos e as subclasses testadas foi verificada por meio do teste do Qui-quadrado e *Odds Ratio* com Intervalo de Confiança 95%. A resposta específica de IgG total e

subclasses no teste de ELISA em 217 plasmas de recém-nascidos e de suas respectivas mães foi quantificada e comparada pelo teste de McNemar como amostras pareadas.

Uma análise descritiva (univariada) dos dados foi realizada, comparando-se os resultados do teste de ELISA com as lesões oftalmológicas (lesão ativa, lesão cicatrizada, lesão cicatrizada e ativa e sem lesão), sinais neurológicos (presente e ausente) e déficit auditivo (presente e ausente) encontrados nos 175 recém-nascidos com toxoplasmose congênita confirmada.

As prevalências de anticorpos e as frequências de interesse (sinais clínicos) entre as crianças foram comparadas utilizando-se o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. A medida de associação utilizada foi a *Odds* Relativa (IC95%).

Para comparar as diferenças entre as variáveis contínuas, as medianas e médias de IR foram utilizados, empregando o teste de Kruskal-Wallis (ou o teste de Mann-Whitney) e o teste t de Student, respectivamente (KNOTTNERUS, 2002). O teste F foi realizado ao se comparar amostras que apresentaram variâncias diferentes; já o teste de Dunn foi utilizado para fazer uma comparação das medianas entre dois grupos.

Os programas OpenEpi (versão 2.3.1), GraphPad Prism (versão 5.03) e SPSS Statistics (versão 17.0.0) foram utilizados para a análise dos resultados.



## **6. RESULTADOS**

## 6.1 Padronização do teste de ELISA

Os parâmetros utilizados para o teste de ELISA indireto utilizando anticorpos conjugados com biotina foram padronizados considerando os melhores valores de S/N (signal-to-noise), os quais consistem na razão entre o valor absoluto médio de absorbância de três plasmas positivos e o valor absoluto médio de absorbância de três plasmas negativos.

O primeiro passo da padronização do ELISA para IgG total foi avaliar o tempo necessário de bloqueio, após sensibilização com STAg. Simultaneamente foi avaliada a diluição ideal de estreptavidina-peroxidase. Para isto, uma placa foi bloqueada com caseína 2% por 60 minutos e outra por 120 minutos. A Figura 4 mostra que o tempo ideal para bloqueio foi de 60 minutos e a diluição ideal da estreptavidina-peroxidase foi de 1:4000. Para todos os testes ficou estabelecida a utilização de uma etapa de bloqueio da placa de ELISA, por um período de 60 minutos e diluição da estreptavidina-peroxidase 1:4000.

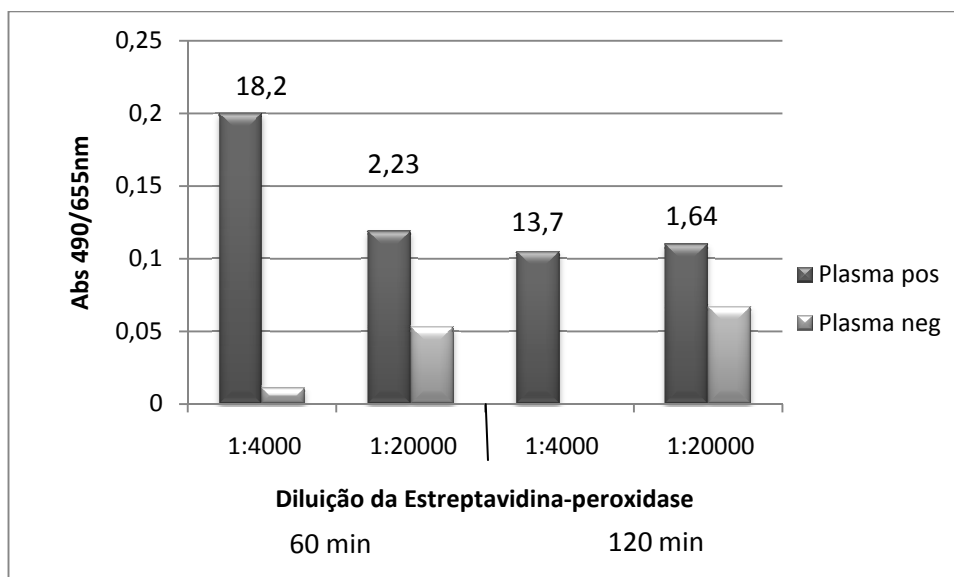


Figura 4. Comparação do tempo de bloqueio (60 e 120 minutos) e da reatividade de duas diluições de estreptavidina-peroxidase (1:4000 e 1:20000) para o teste de ELISA pesquisando IgG total contra STAg. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

### 6.1.1 STAg

Para padronização do ELISA na pesquisa de anticorpos IgG totais e suas subclasses, utilizando STAg, foram testados inicialmente como parâmetros a concentração do antígeno e diluições do conjugado (Figura 5). Posteriormente foram analisadas outras soluções de bloqueio e diluições do plasma (Figura 6).

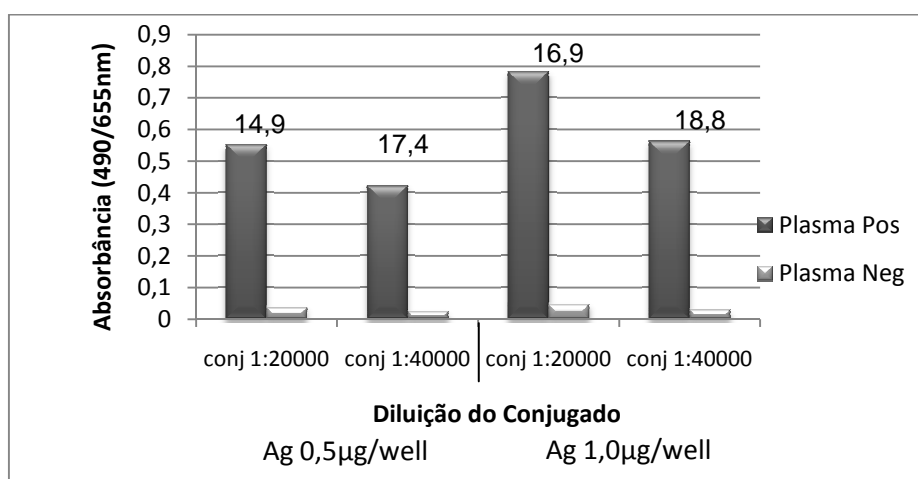


Figura 5. Comparação entre duas concentrações de STAg (0,5µg/ml e 1,0 µg/ml) e duas diluições do conjugado (1:20000 e 1:40000) para utilização em teste de ELISA para pesquisa de IgG total anti-STAg. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas

Os melhores valores de S/N para o teste de ELISA, utilizando STAg, foram encontrados utilizando 1,0µg/well de antígeno. Apesar de apresentar S/N ligeiramente maior ao se utilizar o conjugado diluído 1:40.000, optou-se por utilizá-lo na diluição 1:20.000 por apresentar maiores valores de absorvância.

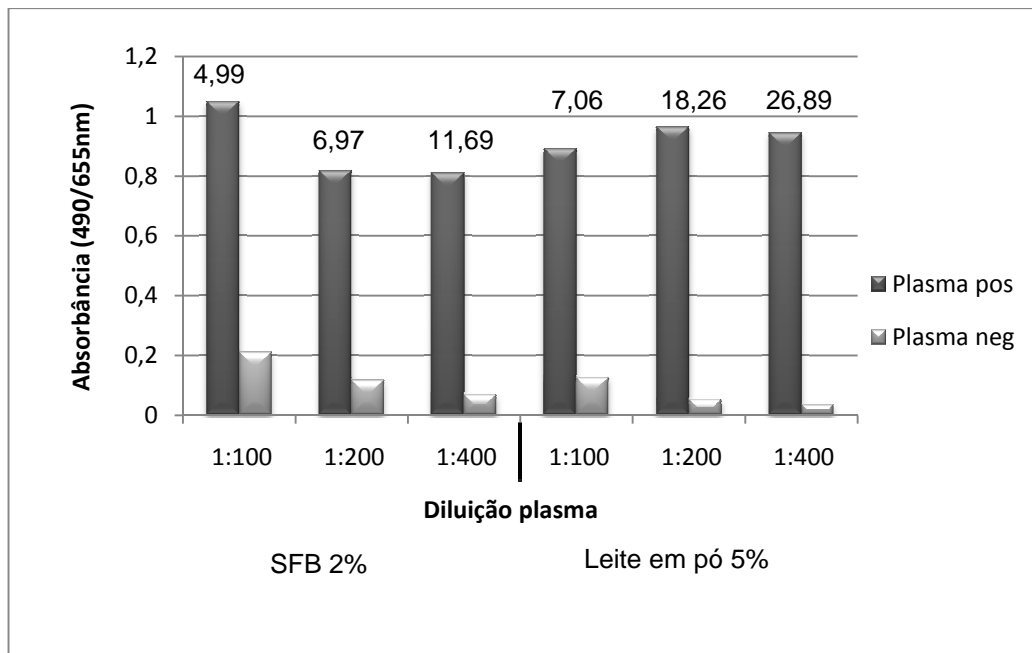


Figura 6. Influência da solução de bloqueio e da diluição do plasma no teste de ELISA com STAg para pesquisa de anticorpos IgG totais. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

A solução de bloqueio que obteve melhor resultado na padronização para IgG total foi o leite em pó desnatado 5%, diluindo o plasma 1:400 (Figura 6).

Para as subclasses de IgG, a padronização foi iniciada com a concentração fixa de 1,0 µg/well de antígeno bruto, testando soluções de bloqueio já descritas na literatura e diferentes diluições do conjugado, para posteriormente reavaliar a concentração de antígeno e a diluição do plasma.

Para IgG1, excelentes resultados para os valores de S/N foram observados com as duas soluções de bloqueio testadas, sendo escolhido o leite em pó desnatado a 5%. Já para IgG2 e IgG4, melhores resultados foram encontrados bloqueando com soro fetal bovino 2% e, para IgG3, bloqueado com gelatina 0,2%. Resultados da padronização de parâmetros do ELISA para IgG1 estão apresentados nas Figuras 7 e 8, como representativos para as outras subclasses. A diluição escolhida para o anticorpo conjugado com biotina foi 1:8000 para IgG1, 1:5000 para IgG2 e IgG4 e 1:4000 para IgG3.

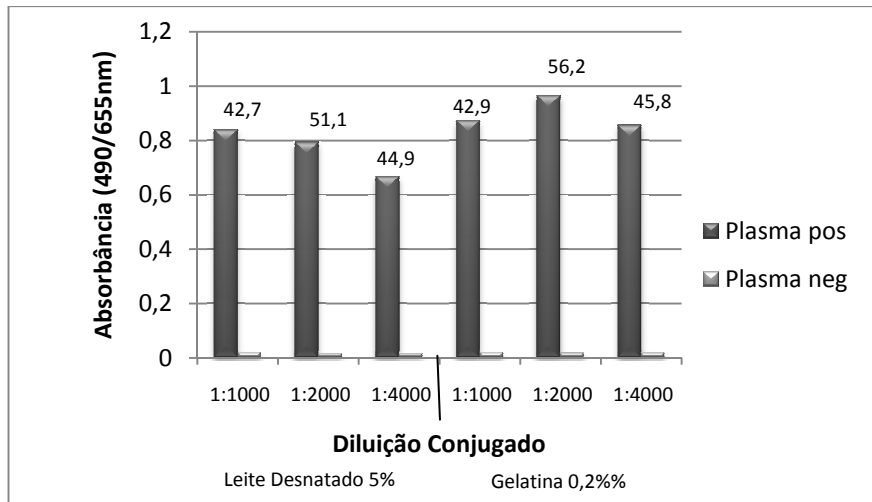


Figura 7. Comparação da utilização de duas soluções de bloqueio (Leite em pó desnatado a 5% e gelatina 0,2%) e três diluições do conjugado anti-IgG1 (1:1000,1:2000 e 1:4000) para o teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

Para todas as subclasses de IgG foram alcançados excelentes resultados na padronização do ELISA ao ser utilizado antígeno bruto nas concentrações de 0,5 e 1,0µg/well (Figura 8). Optou-se pela concentração de 1,0µg/well para IgG total e para todas as subclasses de IgG. Padronizou-se a diluição do plasma para pesquisa de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* em 1:100 e para as demais subclasses 1:50.

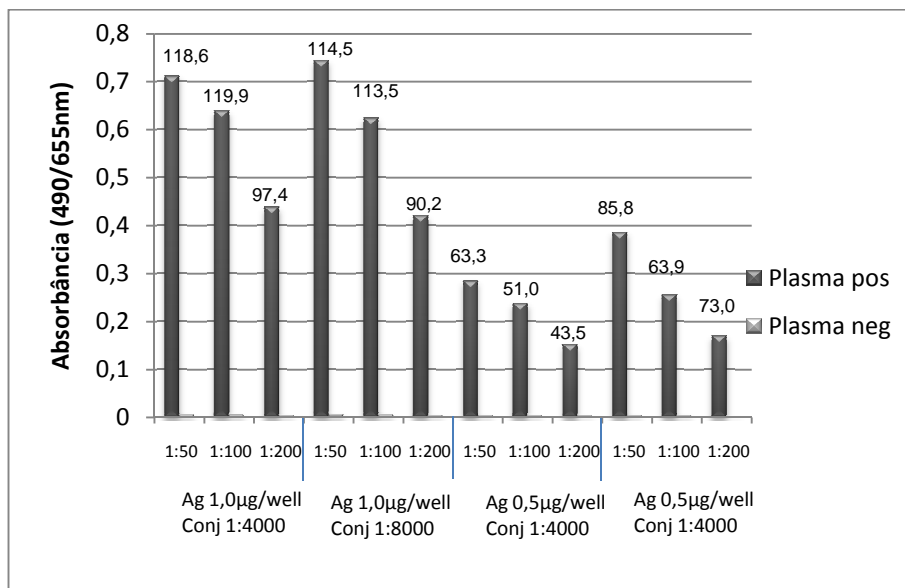


Figura 8. Comparação da reatividade de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* utilizando diferentes diluições do plasma (1:50, 1:100 e 1:200) e do conjugado (1:4000 e 1:8000) e concentrações do STAg (0,5µg/well e 1,0µg/well). Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

Os resultados dos parâmetros ideais para execução do ELISA com STAg estão sumarizados na Tabela 1.

**Tabela 1. Sumário dos parâmetros ideais para execução do ELISA utilizando STAg.**

Anticorpo	Antígeno ( $\mu\text{g}/\text{well}$ )	Bloqueio	Plasma (Diluição)	Conjugado (Diluição)
IgG total	1,0	Leite desnatado 5%	1:400	1:20.000
IgG1	1,0	Leite desnatado 5%	1:100	1:8.000
IgG2	2,5	Soro fetal bovino 2%	1:50	1:5.000
IgG3	1,0	Soro fetal bovino 2%	1:50	1:4.000
IgG4	1,0	Gelatina 0,2%	1:50	1:5.000

### 6.1.2 rSAG1

Para padronização do ELISA na pesquisa de anticorpos IgG totais e suas subclasses, utilizando como antígeno a proteína recombinante SAG1, foram testados como parâmetros iniciais a concentração do antígeno e solução de bloqueio, para posteriormente serem analisadas a diluição do conjugado e diluição do plasma.

No teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG totais, o melhor valor de S/N foi observado utilizando o antígeno na concentração de  $0,25\mu\text{g}/\text{well}$  e bloqueio com soro fetal bovino 2% (Figura 9). Além disso, melhor valor de S/N foi encontrado quando o plasma foi diluído 1:100 e o conjugado anti-IgG total 1:20000 (Figura 10).

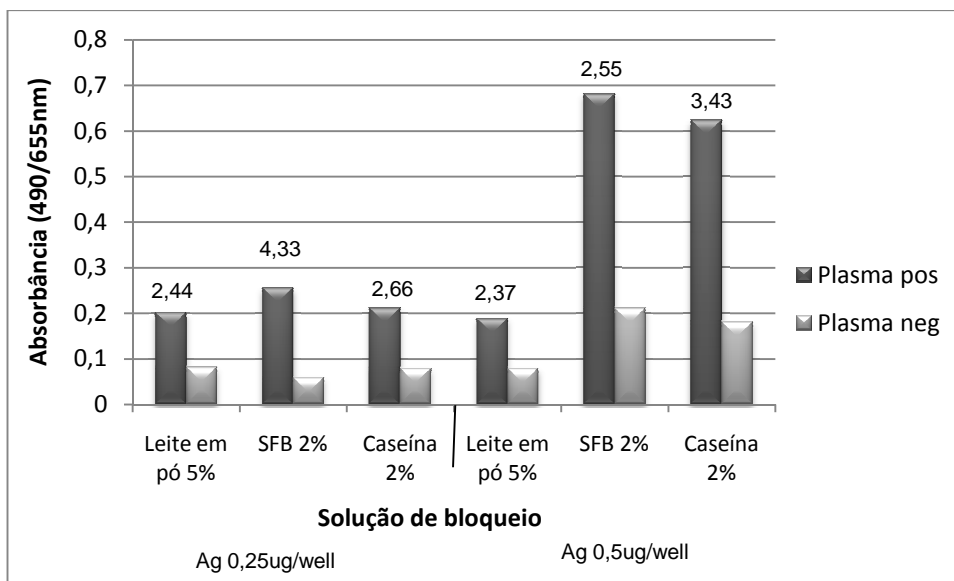


Figura 9. Comparação da utilização de duas concentrações do antígeno (0,25µg/well e 0,5µg/well) e três soluções de bloqueio (Leite desnatado 5%, soro fetal bovino 2% e caseína 2%) para o teste de ELISA na pesquisa de anticorpos IgG totais anti-rSAG1 de *T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

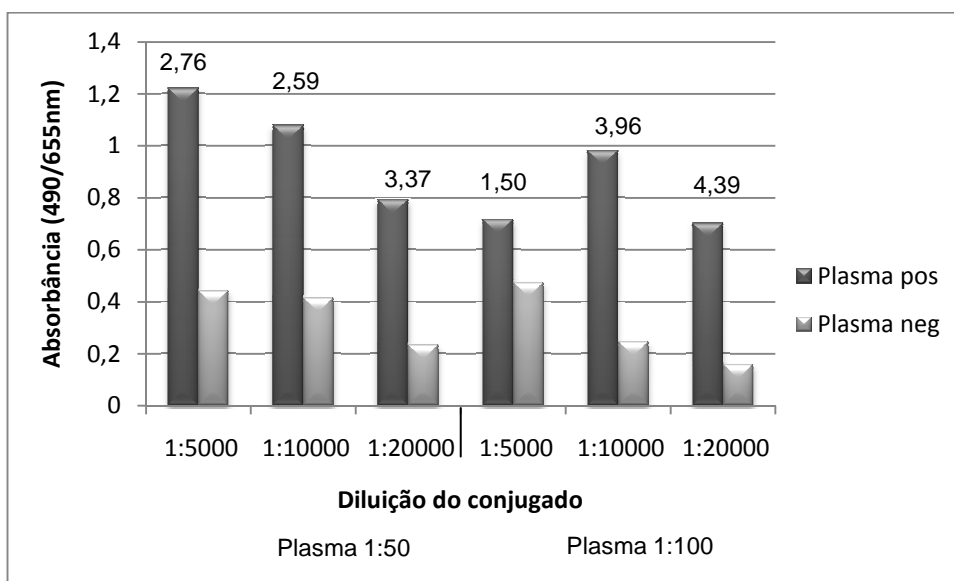


Figura 10. Comparação da reatividade de duas diluições do plasma (1:50 e 1:100) e três diluições do conjugado (1:5000, 1:10000 e 1:20000) para utilização em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG totais anti-rSAG1 de *T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

A Figura 11 exemplifica a avaliação de dois parâmetros (concentração de proteína e solução de bloqueio) para pesquisa de IgG1 anti-rSAG1 de *T. gondii* por ELISA. Melhores resultados foram obtidos usando soro fetal bovino a 2% como agente bloqueador. Apesar da concentração de 0,5µg de rSAG1/well ter apresentado valor de

S/N maior que o observado para 0,25 µg de proteína (17,0 e 14,4 respectivamente), optamos por utilizar a menor concentração da proteína recombinante, devido ao grande número de amostras de plasmas a ser avaliado, evitando o risco da quantidade disponível de rSAG1 ser insuficiente para a realização de todo o trabalho. Para todas as outras subclasses de IgG, os maiores valores de S/N foram observados utilizando-se a proteína recombinante SAG1 na concentração 0,25 µg/well e solução de bloqueio soro fetal bovino 2%.

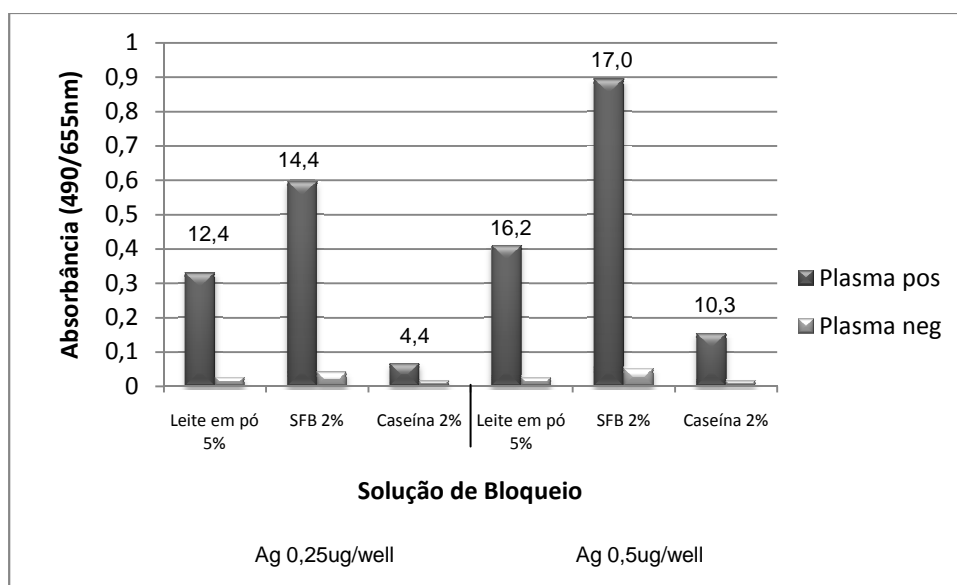


Figura 11. Comparação da utilização de duas concentrações do antígeno rSAG1 (0,25µg/well e 0,5µg/well) e três soluções de bloqueio (Leite desnatado 5%, soro fetal bovino 2% e caseína 2%) para o teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

A diluição do plasma foi padronizada em 1:100 em todas as subclasses, exceto para IgG4, a qual utilizou diluição de 1:50. O anticorpo conjugado com biotina foi empregado na diluição 1:5000 para IgG1 (Figura 12), IgG2 e IgG4 e 1:10000 para IgG3.



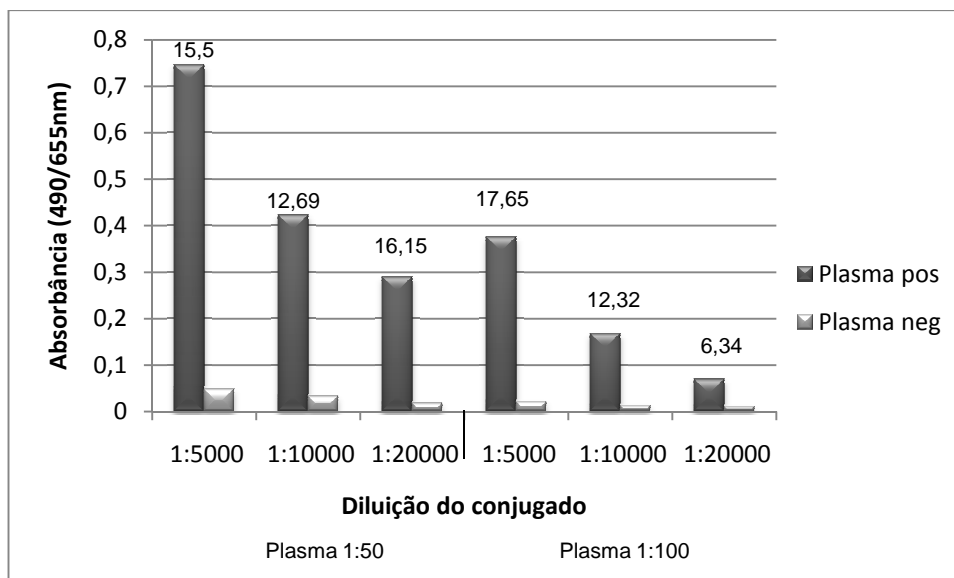


Figura 12. Comparação da reatividade de duas diluições do plasma (1:50 e 1:100) e três diluições do conjugado (1:5000, 1:10000 e 1:20000) para utilização em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1 anti-rSAG1 de *T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

Os resultados dos parâmetros ideais para execução do ELISA com rSAG1 estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Sumário dos parâmetros ideais para execução do ELISA utilizando rSAG1 de *T. gondii*.

Anticorpo	Antígeno ( $\mu\text{g}/\text{well}$ )	Bloqueio	Plasma (Diluição)	Conjugado (Diluição)
IgG total	0,25	Soro fetal bovino 2%	1:100	1:20000
IgG1	0,25	Soro fetal bovino 2%	1:100	1:5000
IgG2	0,25	Soro fetal bovino 2%	1:100	1:5000
IgG3	0,25	Soro fetal bovino 2%	1:100	1:10000
IgG4	0,25	Soro fetal bovino 2%	1:50	1:5000

### 6.1.3 rMIC3

Na padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG total e suas subclasses, utilizando como antígeno a proteína recombinante MIC3, foram testados como parâmetros iniciais a concentração do antígeno e solução de bloqueio para posteriormente serem analisadas a diluição do conjugado e diluição do plasma.

Apesar da concentração de  $0,5\mu\text{g}$  de rMIC3/well ter apresentado valor de S/N maior que o observado para  $0,25\mu\text{g}$  de proteína, ao se pesquisar IgG total (Figura 13),

optamos por utilizar a menor concentração da proteína recombinante, devido ao grande número de amostras de plasmas a ser avaliado, evitando o risco da quantidade disponível de rMIC3 ser insuficiente para a realização de todo o trabalho. Para todas as subclasses de IgG os melhores valores de S/N utilizando rMIC3 como antígeno foram encontrados na concentração de 0,25 µg/well. Leite em pó a 5% foi a solução de bloqueio empregada ao se pesquisar IgG1, e soro fetal bovino a 2% para as demais subclasses (Figuras 15 e 16).

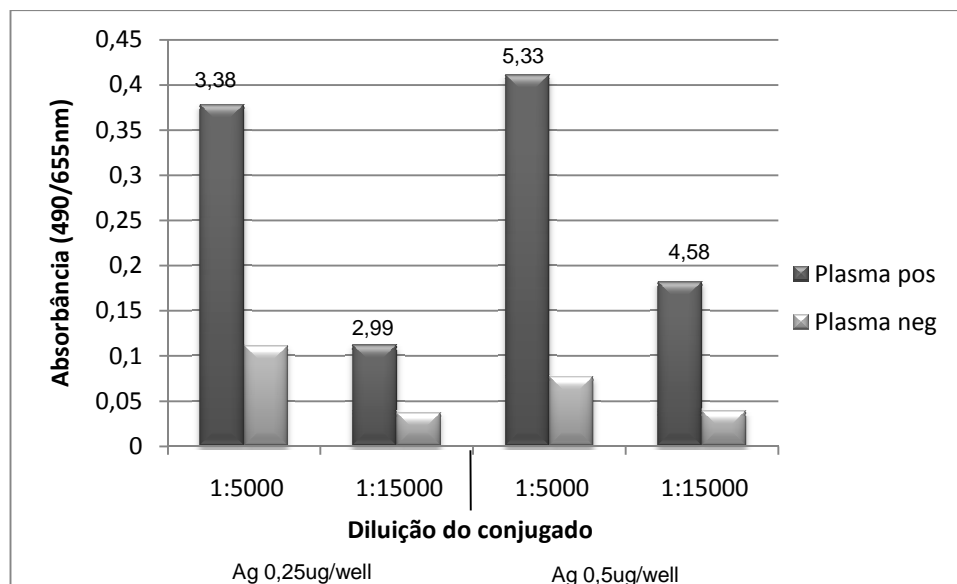


Figura 13. Comparação da utilização de duas concentrações do antígeno rMIC3 (0,25µg/well e 0,5µg/well) e duas diluições do conjugado (1:5000 e 1:15000) para o teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

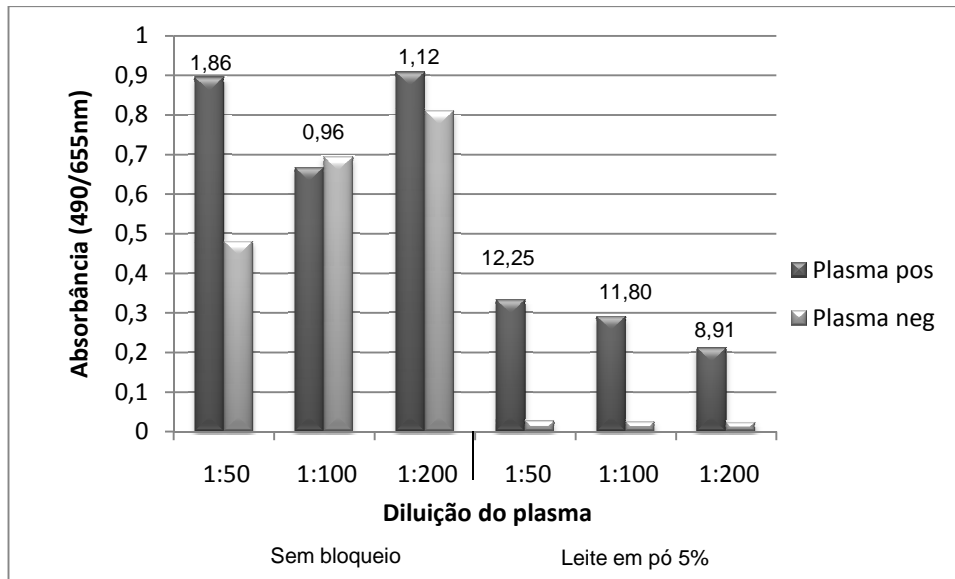


Figura 14. Comparação da reatividade de três diluições do soro (1:50 e 1:100 e 1:200) sem ou com bloqueio (leite desnatado 5%) para utilização em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

O anticorpo conjugado com biotina foi utilizado a 1:2500 para IgG2 e IgG3, e 1:5000 para IgG1 e IgG4 (Figura 15). A utilização do plasma foi padronizada para todas as subclasses na diluição 1:50, exceto para IgG1, no qual o plasma foi diluído 1:100 (Figura 16).

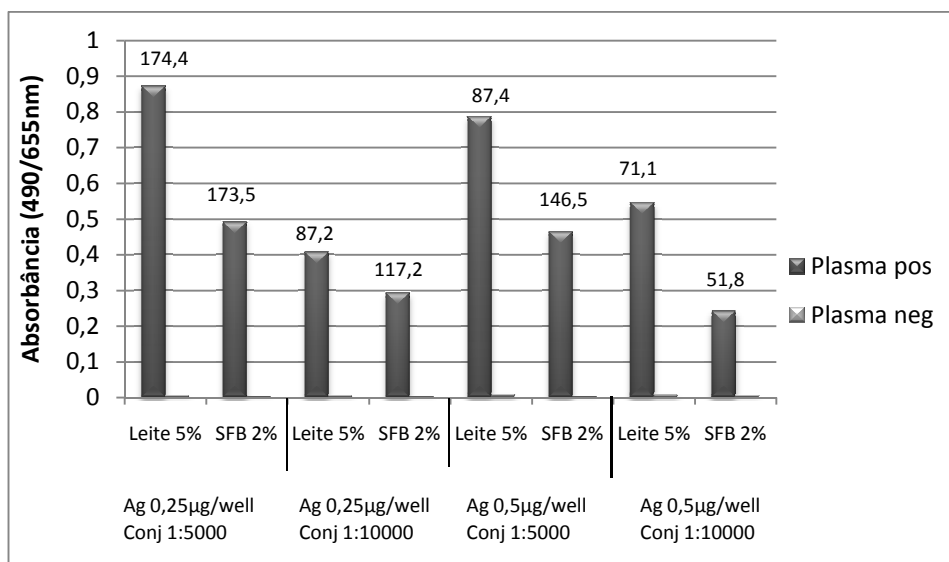


Figura 15. Comparação entre a utilização de duas concentrações do antígeno rMIC3 (0,25µg/well e 0,5µg/well) e duas soluções de bloqueio (Leite desnatado 5% e soro fetal bovino 2%) para o teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* quando utilizado em duas diluições distintas do conjugado (1:5000 e 1:10000). Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

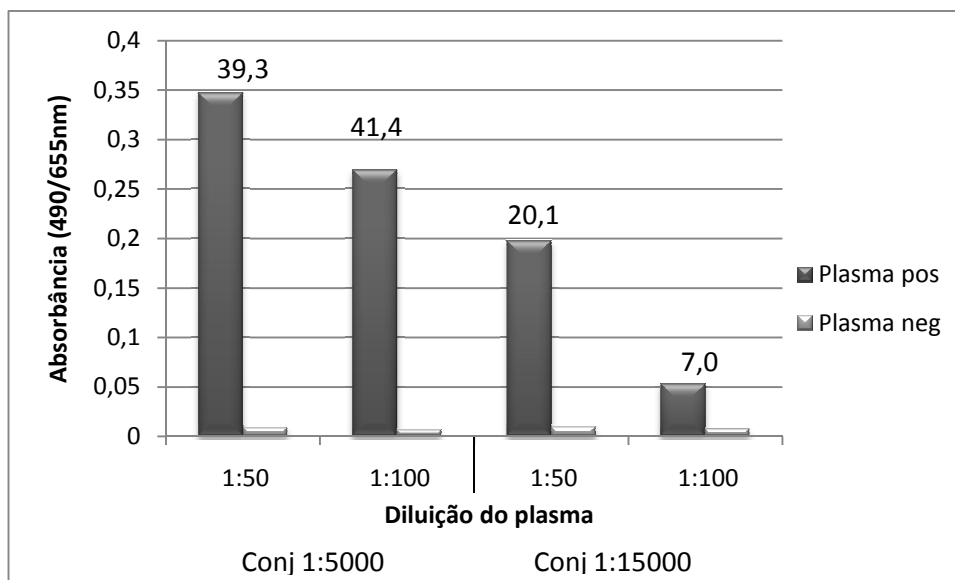


Figura 16. Comparação da reatividade de duas diluições do plasma (1:50 e 1:100) e duas diluições do conjugado (1:5000 e 1:15000) para utilização em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1 anti-rMIC3 de *T. gondii*. Os valores S/N calculados estão indicados acima das colunas.

Os resultados dos parâmetros ideais para execução do ELISA com rMIC3 estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Sumário dos parâmetros ideais para execução do ELISA utilizando rMIC3 de *T. gondii*.

Anticorpo	Antígeno (ug/well)	Bloqueio	Plasma (Diluição)	Conjugado (Diluição)
IgG total	0,25	Leite desnatado 5%	1:50	1:5000
IgG1	0,25	Leite desnatado 5%	1:100	1:5000
IgG2	0,25	Soro fetal bovino 2%	1:50	1:2500
IgG3	0,25	Soro fetal bovino 2%	1:50	1:2500
IgG4	0,25	Soro fetal bovino 2%	1:50	1:5000

## 6.2 ELISA em plasma de 217 recém nascidos com suspeita de toxoplasmose congênita.

Os resultados do ELISA em Índice de Reatividade (IR) para pesquisa de IgG e subclasses de IgG nos plasmas de 175 crianças com toxoplasmose congênita confirmada e de 42 crianças normais estão apresentados no Anexo. Os Anexos-Tabelas 1, 2 e 3

mostram os valores em IR do ELISA para pesquisa de anticorpos anti-STAg, rSAG1 e rMIC3, respectivamente.

Inicialmente foi quantificada a resposta específica de IgG total e subclasses nos plasmas das 217 crianças com o objetivo de avaliar a proporção de crianças com anticorpos para STAg, rSAG1 e rMIC3. A prevalência da resposta de IgG total foi maior para STAg (97,2%) quando comparada com rSAG1 (96,3%) e rMIC3 (80,2%) (Figura 17a). Comportamento semelhante foi observado para IgG1, enquanto para IgG2 e IgG3 a prevalência de anticorpos reativos à rMIC3 foi maior do aquela para rSAG1. Já para IgG4 maior prevalência foi encontrada nos testes para rMIC3 (51,2%), seguido de STAg (33,6%) e rSAG1 (17,5%) (Figura 17e).

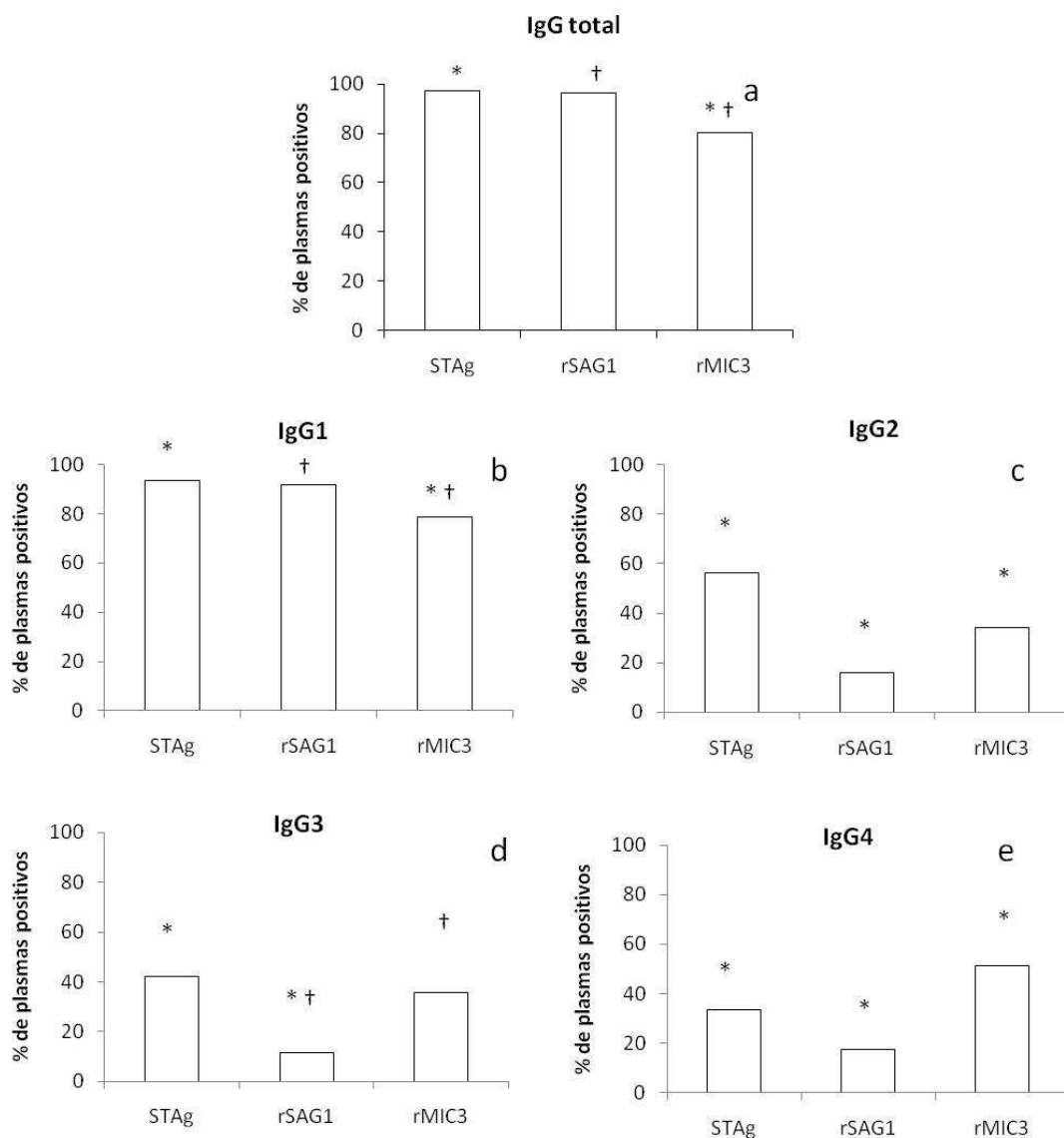


Figura 17. Prevalência da resposta de IgG e subclasses para STAg e as duas proteínas recombinantes. Os plasmas foram considerados positivos quando os valores de IR (índice de reatividade) foram superiores a 1. a. IgG total; b. IgG1; c. IgG2; d. IgG3 e e. IgG4. Símbolos iguais acima das colunas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na proporção de plasmas positivos utilizando diferentes antígenos, pelo teste de McNemar.

A reatividade dos plasmas de 175 crianças com toxoplasmose congênita também foi alta ao se pesquisar IgG total, com mais de 84% de plasmas positivos, independente do antígeno utilizado (Tabela 4). No caso de IgG1 a reatividade foi maior, sendo que mais de 90% dos plasmas reagiram com os antígenos testados. Para as demais subclasses houve reatividades moderadas, observando-se diferenças estatisticamente significativas, principalmente ao se utilizar rMIC3 (Figura 18).

**Tabela 4. Reatividade de 217 amostras de plasma (175 crianças com toxoplasmose congênita confirmada e 42 crianças normais) de crianças para IgG total e subclasses anti-*T. gondii***

	Grupos	nº(%) [p]* de amostras reativas em ELISA para diferentes antígenos		
		STAg	rSAG1	rMIC3
IgG total	Infectados	172(98,3)	174(99,4)	148(84,6)
	Não-infectados	39(92,9)[0,08]	35(83,3)[<0,05]	26(61,9)[<0,05]
IgG1	Infectados	168(96,0)	167(95,4)	158(90,3)
	Não-infectados	35(83,3)[<0,05]	32(76,2)[<0,05]	13(31,0)[<0,05]
IgG2	Infectados	107(61,1)	24(13,7)	72(41,1)
	Não-infectados	15(35,7)[<0,05]	11(26,2)[0,06]	2(4,8)[<0,05]
IgG3	Infectados	85(48,6)	22(12,6)	77(44,0)
	Não-infectados	6(14,3)[<0,05]	3(7,1)[0,42]	0(0,0)[<0,05]
IgG4	Infectados	64(36,6)	28(16,0)	109(62,3)
	Não-infectados	9(21,4)[0,07]	10(23,8)[0,25]	2(4,8)[<0,05]

\*valor p pelo  $\chi^2$  comparando crianças infectadas e não-infectadas

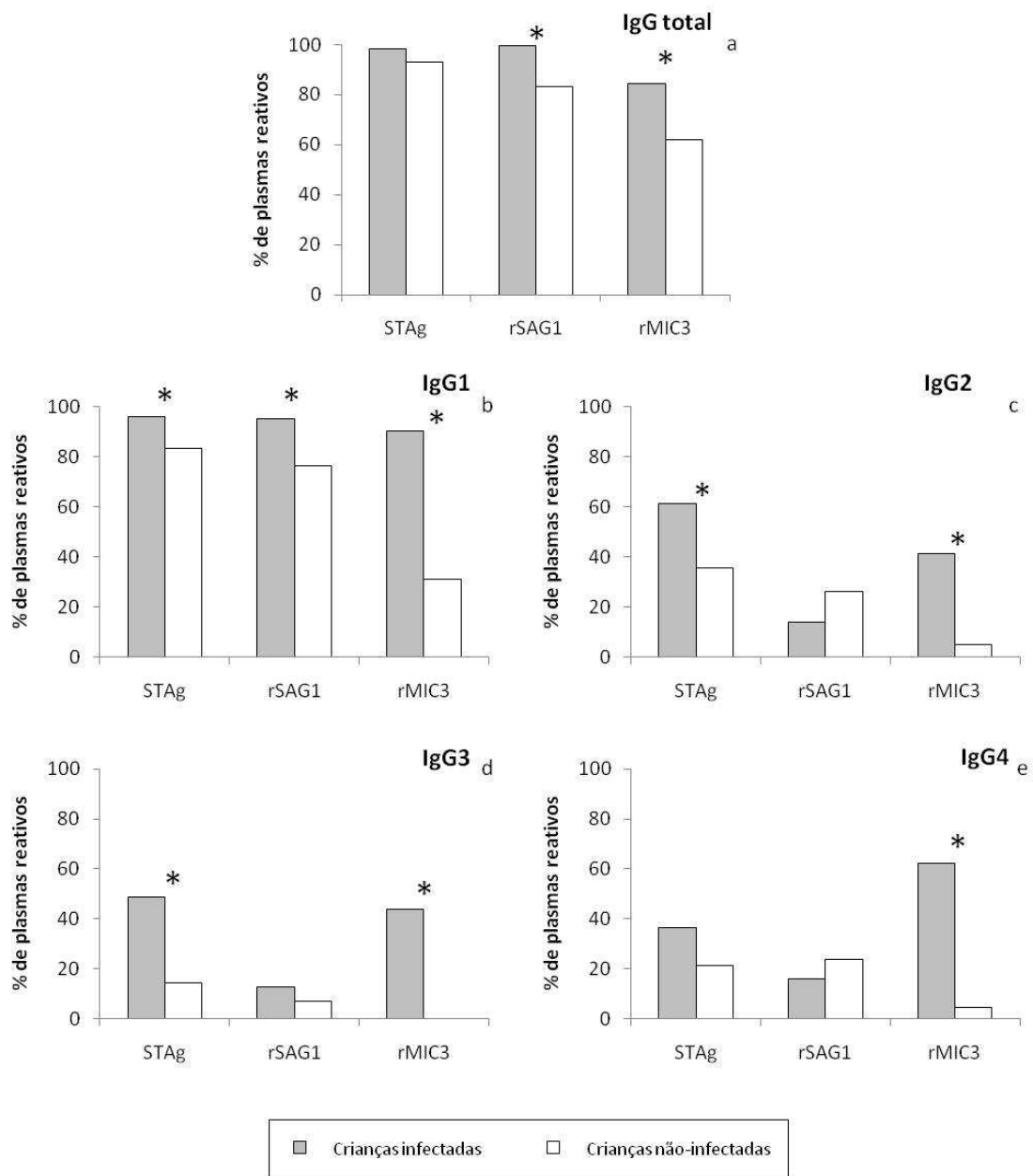


Figura 18. Reatividade de IgG e subclasses para STAg e as duas proteínas recombinantes em plasma de 175 crianças com toxoplasmose congênita e 42 crianças não-infectadas. Os plasmãs foram considerados positivos quando os valores de IR (índice de reatividade) foram superiores a 1. a. IgG total; b. IgG1; c. IgG2; d. IgG3 e e. IgG4. Asterisco indica  $p < 0,05$ .

As medidas estatísticas e a representação gráfica da distribuição dos resultados em IR do ELISA com STAg, rSAG1 e rMIC3 de *T. gondii* encontram-se nas tabelas 5, 6 e 7, respectivamente e na figura 19.



**Tabela 5. Medidas estatísticas dos índices de reatividade de anticorpos IgG e subclasses anti-*T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita empregando STAg.**

Medidas Estatísticas	IgG total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
n*	216	215	216	216	215
Mínimo	-0,06203	0,1834	0,02774	-0,05216	-0,06487
Mediana	3,824	9,05	1,095	0,8191	0,7954
Máximo	10,5	45,38	5,083	7,861	4,942
Média	4,232	11,61	1,307	1,187	0,8682
Desvio-padrão	2,414	9,075	0,9201	1,162	0,6544

\*total de crianças avaliadas

**Tabela 6. Medidas estatísticas dos índices de reatividade de anticorpos IgG e subclasses anti-*T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita empregando como antígeno rSAG1.**

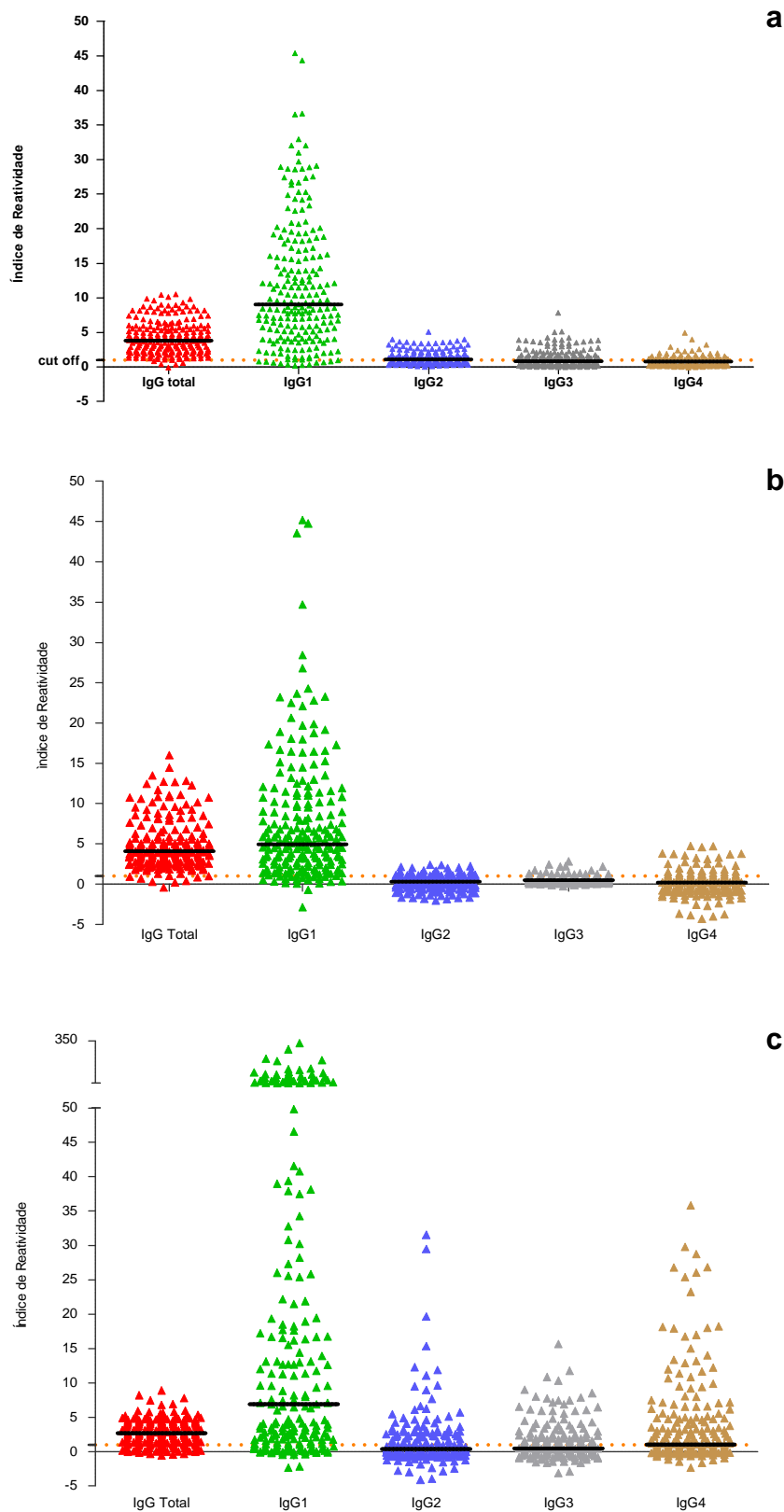
Medidas Estatísticas	IgG Total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
n*	217	217	217	217	217
Mínimo	-0,4181	-2,831	-2,011	-0,2548	-4,292
Mediana	4,056	4,956	0,2958	0,4859	0,1678
Máximo	16,01	45,19	2,409	2,814	4,747
Média	4,757	7,49	0,2658	0,5519	0,2051
Desvio-padrão	2,973	7,726	0,8175	0,4418	1,382

\*total de crianças avaliadas

**Tabela 7. Medidas estatísticas dos índices de reatividade de anticorpos IgG e subclasses anti-*T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita empregando como antígeno proteína recombinante MIC3 de *T. gondii*.**

Medidas Estatísticas	IgG Total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
n*	213	217	217	217	217
Mínimo	-0,5658	-2,328	-4,084	-7,313	-2,323
Mediana	2,673	6,904	0,3926	0,4495	1,028
Máximo	8,917	334,4	31,55	15,65	35,81
Média	2,726	27,31	1,501	1,281	3,653
Desvio-padrão	1,83	48,54	4,022	2,714	6,338

\*total de crianças avaliadas



**Figura 19.** Índice de reatividade de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita empregando a. STAg b. rSAG1 e c. rMIC3. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às medianas das determinações. Índice de Reatividade: densidade óptica do plasma teste/cut off.

### **6.3 Análise dos Índices de Sensibilidade, Especificidade, Razão de Verossimilhança**

Para os diferentes parâmetros testados com o plasma dos recém-nascidos (idade média de  $55,6 \pm 16,6$  dias), os índices de sensibilidade e especificidade e razão de verossimilhança positiva e negativa foram obtidos através da utilização do programa estatístico open source OpenEpi, .

#### **6.3.1 STAg**

Ao ser realizado o teste de ELISA com STAg para pesquisa de anticorpos IgG total e suas subclasses, foram observados diferentes valores nos índices.

Para IgG total a sensibilidade do teste foi de 98,8%, enquanto a especificidade foi de 7,1%. Já a razão de verossimilhança positiva encontrada foi de 1,065, enquanto a negativa foi de 0,16 (Tabela 8).

Para IgG1 os índices de sensibilidade e especificidade foram de 97,1% e 16,6%, respectivamente. As razões de verossimilhança positiva e negativa foram de 1,165 e 0,173, respectivamente (Tabela 8).

A sensibilidade do teste para IgG2 foi 61,4%, enquanto sua especificidade foi de 64,2%. As razões de verossimilhança positivas e negativas foram, respectivamente de 1,722 e 0,599 (Tabela 8).

Para IgG3 foram observados 46,5% e 85,7% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. A razão de verossimilhança positiva encontrada foi de 3,259 e a negativa 0,623 (Tabela 8).

Para IgG4 a sensibilidade observada foi de 36,4% e a especificidade 78,5%. A razão de verossimilhança positiva observada foi de 1,699 e negativa de 0,802 (Tabela 8).

**Tabela 8. Determinação da validade dos testes de ELISA utilizando STAg para pesquisa de anticorpos IgG totais e suas subclasses**

	<b>Sens (%)<sup>a</sup>[IC95%]</b>	<b>Espec (%)<sup>b</sup>[IC95%]</b>	<b>LRP<sup>c</sup></b>	<b>LRN<sup>d</sup></b>
<b>IgG total</b>	98,8 [95,9 – 99,7]	7,1 [2,4 – 19,0]	1,065	0,16
<b>IgG1</b>	97,1 [93,4 – 98,7]	16,6 [8,3 – 30,6]	1,165	0,173
<b>IgG2</b>	61,4 [54,1 – 68,4]	64,2 [49,2 – 77,0]	1,722	0,599
<b>IgG3</b>	46,5 [39,3 – 53,9]	85,7 [72,1 – 93,3]	3,259	0,623
<b>IgG4</b>	36,4 [29,6 – 43,81]	78,5 [64,0 – 88,3]	1,699	0,802

<sup>a</sup> Sensibilidade

<sup>b</sup> Especificidade

<sup>c</sup> Razão de Verossimilhança Positiva

<sup>d</sup> Razão de Verossimilhança Negativa

### 6.3.2 r SAG1

Ao ser realizado o teste de ELISA utilizando como antígeno a proteína recombinante SAG1, observou-se na pesquisa de anticorpos IgG totais uma sensibilidade de 99,4% e especificidade de 16,6%. A razão de verossimilhança positiva foi de 1,193 e a negativa 0,034 (Tabela 9).

Ao se testar anticorpos IgG1, observou-se sensibilidade de 95,4% e especificidade de 23,8%, razão de verossimilhança positiva de 1,253 e negativa de 0,192 (Tabela 9).

O teste para pesquisa de anticorpos IgG2 apresentou sensibilidade de 13,7% e especificidade de 73,1%, razão de verossimilhança positiva 0,523 e negativa 1,169 (Tabela 9).

Para IgG3, observou-se 12,5% de sensibilidade e 92,8% de especificidade no teste. A razão de verossimilhança positiva foi de 1,76 e a negativa de 0,941 (Tabela 9).

A pesquisa de IgG4 apresentou 16,5% de sensibilidade e 76,1% de especificidade; a razão de verossimilhança positiva foi de 0,696 e negativa 1,095 (Tabela 9).

**Tabela 9. Determinação da validade dos testes de ELISA utilizando como antígeno a proteína recombinante de *T. gondii* SAG1 para pesquisa de anticorpos IgG totais e suas subclasses.**

	Sens (%) <sup>a</sup> [IC95%]	Espec (%) <sup>b</sup> [IC95%]	LRP <sup>c</sup>	LRN <sup>d</sup>
<b>IgG total</b>	99,4 [96,3 – 99,9]	16,6 [8,3 – 30,6]	1,193	0,034
<b>IgG1</b>	95,4 [91,2 – 97,7]	23,8 [13,5 – 38,5]	1,253	0,192
<b>IgG2</b>	13,7 [9,4 – 19,6]	73,1 [58,9 – 84,7]	0,523	1,169
<b>IgG3</b>	12,5 [8,4 – 18,3]	92,8 [81,0 – 97,5]	1,76	0,941
<b>IgG4</b>	16,5 [11,8 – 22,8]	76,1 [61,5 – 86,5]	0,696	1,095

<sup>a</sup> Sensibilidade

<sup>b</sup> Especificidade

<sup>c</sup> Razão de Verossimilhança Positiva

<sup>d</sup> Razão de Verossimilhança Negativa

### 6.3.3 r MIC3

Ao ser utilizado a proteína recombinante MIC3 no teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG totais anti-*T. gondii*, observou-se uma sensibilidade do teste de 86% e especificidade de 34,8%; razões de verossimilhança positiva e negativa de 1,321 e 0,4, respectivamente (Tabela 10).

Já para pesquisa de IgG1, o teste obteve uma sensibilidade de 90,29% e especificidade de 69,05%; razão de verossimilhança positiva de 2,917 e negativa de 0,14 (Tabela 10).

A sensibilidade do teste para IgG2 foi 95,95%, enquanto sua especificidade foi de 27,27%. As razões de verossimilhança positivas e negativas foram, respectivamente de 1,319 e 0,14 (Tabela 10).

A pesquisa de anticorpos IgG3 anti-*T. gondii* apresentou um teste com sensibilidade de 44% e especificidade de 100%. Por apresentar 100% de especificidade,

a razão de verossimilhança positiva encontrou-se indefinida, enquanto a negativa foi de 0,56 (Tabela 10).

A pesquisa de IgG4 apresentou 62,3% de sensibilidade e 95,2% de especificidade; a razão de verossimilhança positiva foi de 13,08 e negativa 0,396 (Tabela 10).

**Tabela 10. Determinação da validade dos testes de ELISA utilizando como antígeno a proteína recombinante de *T. gondii* MIC3 para pesquisa de anticorpos IgG totais e suas subclasses.**

	Sens (%) <sup>a</sup> [IC95%]	Espec (%) <sup>b</sup> [IC95%]	LRP <sup>c</sup>	LRN <sup>d</sup>
<b>IgG total</b>	86 [80,0 – 90,4]	34,8 [22,4 – 49,8]	1,321	0,4
<b>IgG1</b>	90,2 [85,0 – 93,8]	69,0 [54,0 – 80,9]	2,917	0,14
<b>IgG2</b>	95,9 [88,7 – 98,6]	27,2 [20,6 – 35,1]	1,319	0,14
<b>IgG3</b>	44 [36,8 – 51,4]	100 [91,6 – 100]	Ind <sup>e</sup>	0,56
<b>IgG4</b>	62,2 [54,9 – 69,1]	95,2 [84,2 – 98,7]	13,08	0,396

<sup>a</sup> Sensibilidade

<sup>b</sup> Especificidade

<sup>c</sup> Razão de Verossimilhança Positiva

<sup>d</sup> Razão de Verossimilhança Negativa

<sup>e</sup> Indeterminado

#### 6.4 Análise comparativa da sorologia das mães e dos respectivos recém-nascidos

As mães suspeitas de infecção com *T. gondii* foram testadas por ELISA anti-STAg, pesquisando anticorpos IgG total e suas subclasses a fim de estabelecer uma análise comparativa com seus respectivos filhos (soro coletado aos 60 dias após o nascimento).

Para verificar se havia concordância entre a sorologia dos recém-nascidos e suas respectivas mães no teste de ELISA ao utilizar proteínas totais de *T. gondii* como antígeno, uma comparação entre a sorologia de mães e recém-nascidos foi estabelecida para as subclasses de IgG através do teste de McNemar. Neste teste, os resultados positivos e negativos das crianças (casos) foram comparados aos resultados das mães

(controles), partindo do pressuposto de que se o recém-nascido apresentava sorologia positiva para *T. gondii*, provavelmente a infecção ocorreu durante a gestação. A Tabela 11 exemplifica esta análise realizada para IgG3. Para esse teste de amostras pareadas o valor “p” foi considerado de acordo com a diferença entre os pares discordantes (crianças positivas com mães negativas [C+M-] versus crianças negativas com mães positivas [C-M+]). No caso de IgG3 houve 58 pares discordantes, sendo 14/58 C+M- (24,1%) e 44/58 C-M+ (75,9%).

**Tabela 11. Frequência de resultados da sorologia dos recém-nascidos em relação à sorologia das mães para IgG3 anti-*T. gondii* em ELISA utilizando antígeno total de *T. gondii*.**

		Sorologia dos Recém-nascidos		
		POSITIVA	NEGATIVA	TOTAL
Sorologia das mães	POSITIVA	76	44	120
	NEGATIVA	14	80	94
	TOTAL	90	124	214

$\chi^2=14,50$   
p= 0,0001

Ao nível de significância de 5%, observou-se que, para as subclasses IgG2, IgG3 e IgG4, houve diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ) entre a proporção de crianças soropositivas as quais tinham mães soronegativas (C+M-), e a proporção de crianças soronegativas as quais tinham mães soropositivas (C-M+), com maior probabilidade de se encontrar anticorpos em crianças soronegativas mas com mães soropositivas. O valor p responde a pergunta: se não há associação entre a infecção por *T. gondii* e a presença de uma determinada subclasse de IgG, qual é a probabilidade de observar a grande discrepância encontrada entre os dois tipos de pares discordantes (C+M- versus C-M+)? O  $p<0,05$  evidencia associação entre a infecção por *T. gondii* e o resultado da sorologia (Tabela 12).

**Tabela 12. Medidas estatísticas do cálculo do teste de McNemar para resultado da sorologia dos recém-nascidos em relação à sorologia das mães através do teste de ELISA para pesquisa de IgG e suas subclasses anti-*T. gondii* utilizando STAg.**

	IgG total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
p <sup>a</sup>	1,0000	0,7518	<0,0001	0,0001	<0,0001
OR <sup>b</sup>	1,33 [0,22 – 9,10]	0,66 [0,13 – 2,81]	0,19 [0,06 – 0,47]	0,31 [0,16 – 0,59]	0,31 [0,16 – 0,55]
C+M <sup>-c</sup>	57,1%	40,0%	16,2%	24,1%	23,9%
C-M <sup>+d</sup>	42,9%	60,0%	83,8%	75,9%	76,1%

<sup>a</sup>valor p

<sup>b</sup>odds ratio [intervalo de confiança 95%]

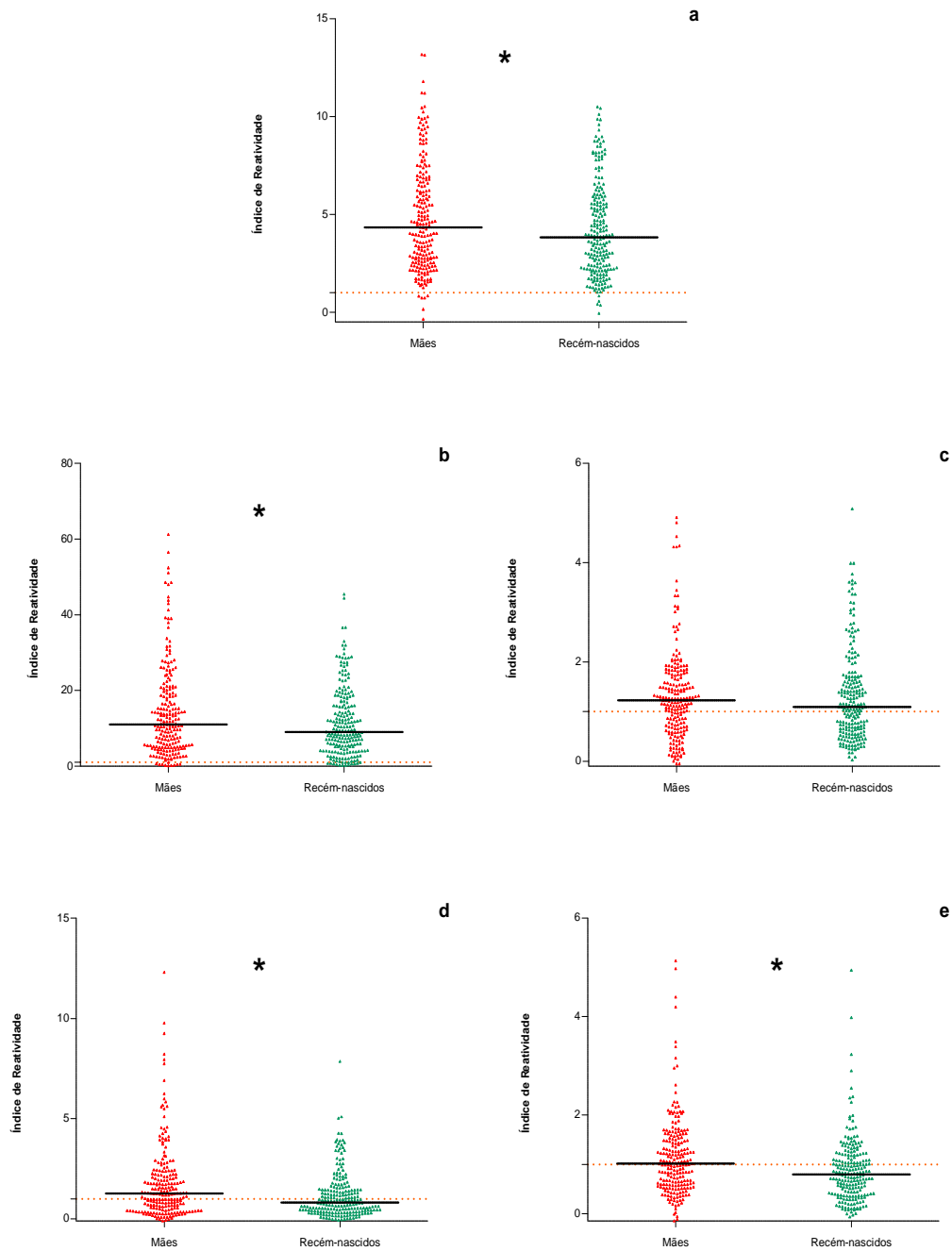
<sup>c</sup>Proporção de crianças infectadas (C+) que tinham mães não-infectadas (M-) com *T. gondii*

<sup>d</sup>Proporção de crianças não-infectadas (C-) que tinham mães infectadas (M+) com *T. gondii*

Os valores médios de índices de reatividade do binômio mãe-criança se mostraram significativamente diferentes para IgG total e para as subclasses IgG1, IgG3 e IgG4 (figura 20). As medidas estatísticas dos resultados das mães em relação aos recém-nascidos encontram-se representadas na tabela 13.

Além disso, comparando as 175 crianças com toxoplasmose congênita confirmada com suas respectivas mães, foi observada diferença significativa entre os valores médios de IR para todas as subclasses, exceto para IgG2. Porém, ao se comparar as 42 crianças não-infectadas com suas respectivas mães, apenas para IgG total e IgG2 não foi observada diferença estatística entre as médias de IR (Figura 21). Apesar disto, nestas duas comparações os valores médios de IR também foram maiores nas mães.





**Figura 20.** Comparação entre os índices de reatividade (IR) de mães e recém-nascidos no teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG utilizando proteínas totais de *T. gondii* como antígeno; a. IR para IgG total; b. IR para IgG1; c. IR para IgG2; d. IR para IgG3; e. IR para IgG4. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias das determinações. Índice de Reatividade: densidade óptica do plasma teste/cut off. Asterisco indica médias significativamente diferentes.

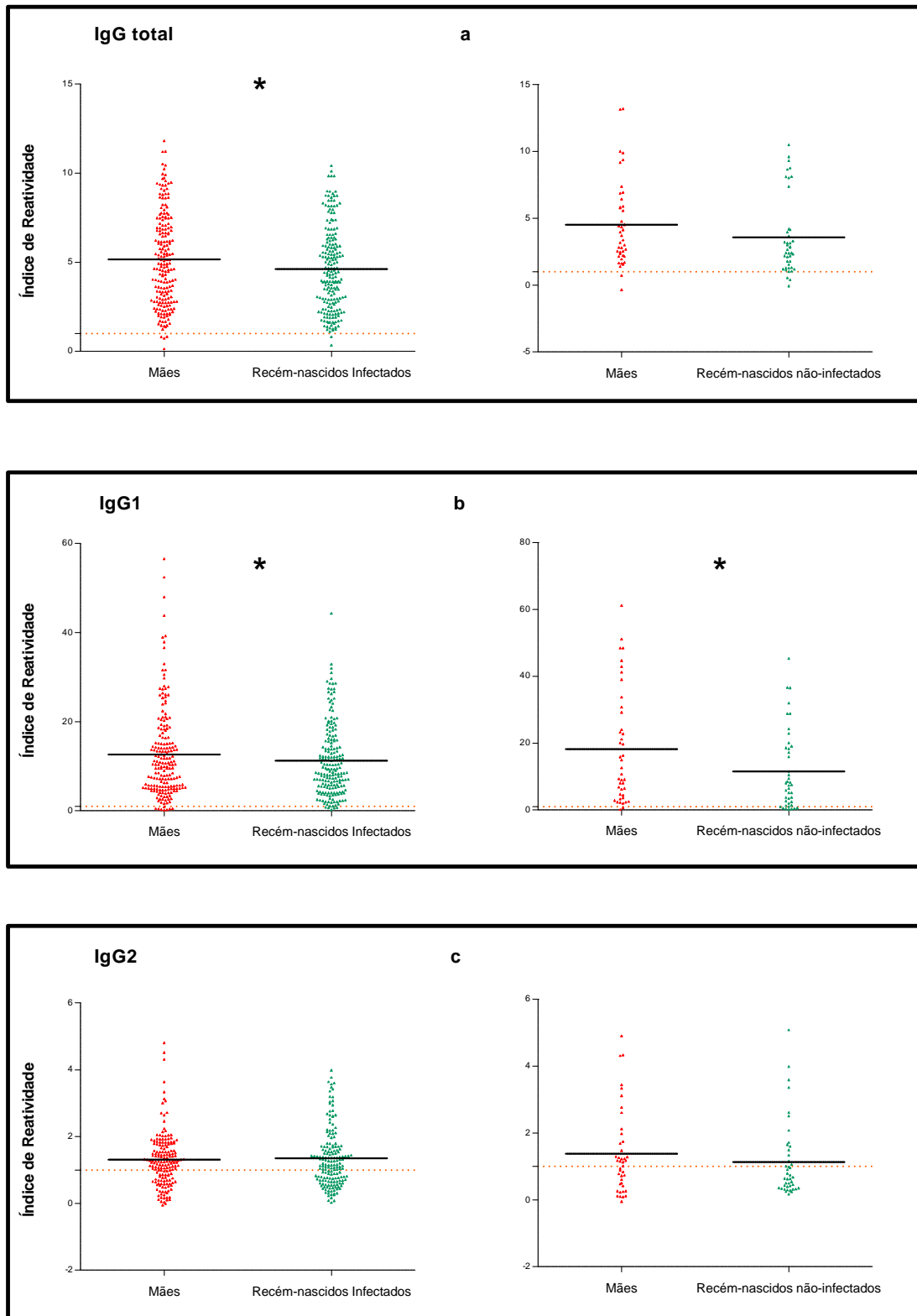


Figura 21. Comparação entre os índices de reatividade (IR) de 175 crianças com toxoplasmose congênita e 42 crianças não-infectadas com suas respectivas mães para (a) IgG total; (b) IgG1; (c) IgG2; (d) IgG3 e (e) IgG4, utilizando STAg. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias das determinações. Índice de Reactividade: densidade óptica do plasma teste/cut off. Asterisco indica médias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

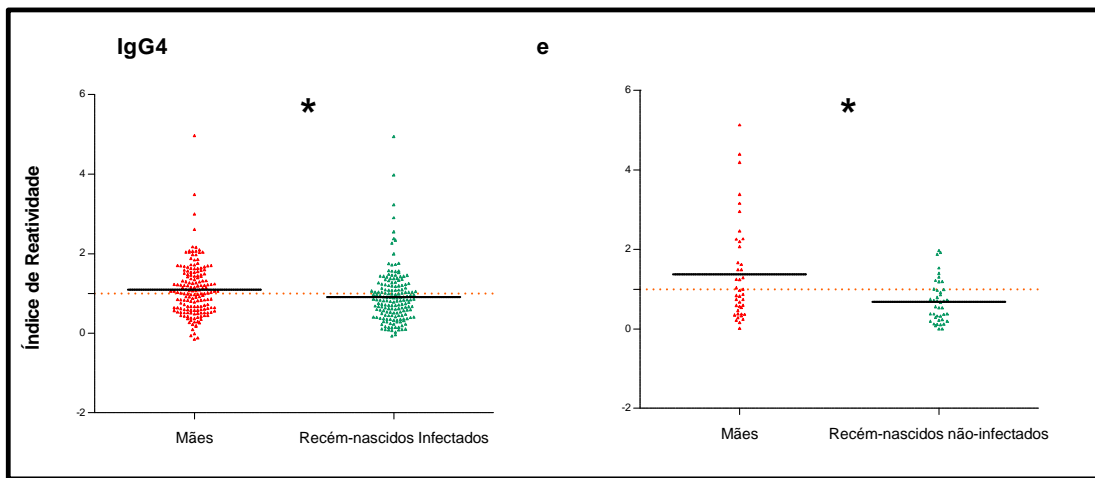
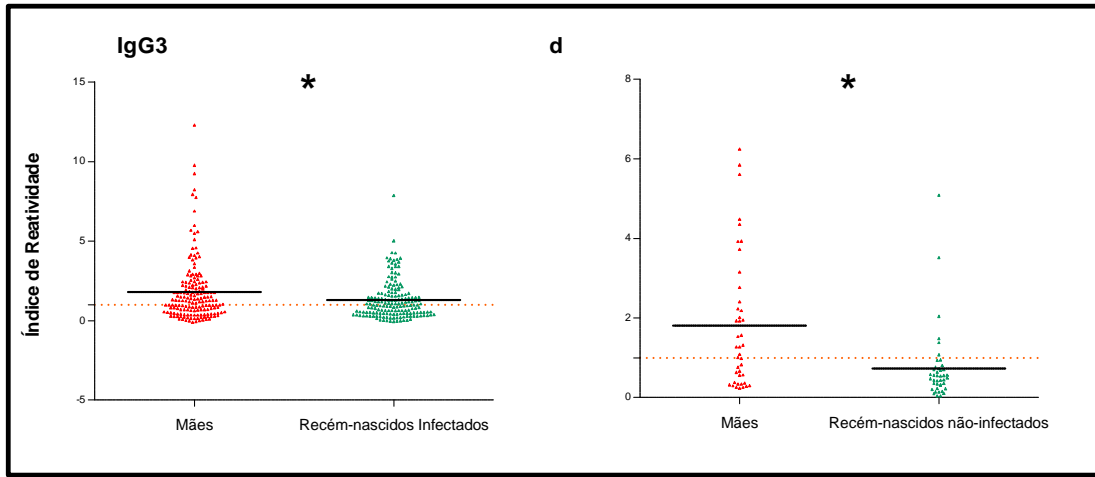


Figura 21. Continua

**Tabela 13. Comparação das medidas estatísticas dos índices de reatividade de anticorpos IgG e subclasses anti-*T. gondii* dos recém-nascidos e suas mães no teste de ELISA utilizando antígenos totais de *T. gondii***

Medidas Estatísticas	IgG total		IgG1		IgG2		IgG3		IgG4	
	RN <sup>a</sup>	Mãe	RN	Mãe	RN	Mãe	RN	Mãe	RN	Mãe
N <sup>b</sup>	216	213	215	214	216	214	216	214	215	214
IR <sup>c</sup> Mínimo	-0,06203	-0,3455	0,1834	0,1004	0,02774	-0,05332	-0,05216	-0,09945	-0,06487	-0,1483
Mediana de IR	3,824	4,336	9,05	11,06	1,095	1,228	0,8191	1,267	0,7954	1,013
IR Máximo	10,5	13,18	45,38	61,18	5,083	4,906	7,861	12,3	4,942	5,131
Média	4,232	4,815[0,0199] <sup>d</sup>	11,61	14,33[0,0089]	1,307	1,324[0,8447]	1,187	1,805[<0,0001]	0,8682	1,148[0,0001]
Desvio-padrão	2,414	2,743	9,075	12,12	0,9201	0,9092	1,162	1,901	0,6544	0,8143

<sup>a</sup> Recém-nascidos

<sup>b</sup> Total de plasmas analisados

<sup>c</sup> IR: índice de reatividade – média da densidade óptica do plasma testado/cut off

<sup>d</sup> [valor p]

## 6.5 Associação dos Resultados do ELISA e o Diagnóstico Clínico de Retinocoroidite em Crianças com Toxoplasmose Congênita

As análises de associação entre os resultados de ELISA e lesões oculares foram realizadas incluindo apenas as 175 crianças com toxoplasmose congênita confirmada. As 45 crianças infectadas mas sem lesão ocular foram consideradas como referência na análise univariada.

### 6.5.1 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígenos Totais Solúveis de *Toxoplasma gondii* (STAg)

#### 6.5.1.1 IgG total para STAg

Uma associação entre os resultados de ELISA para pesquisa de IgG total utilizando STAg (sorologia positiva:  $\geq 1$ , ou negativa: IR  $< 1$ ) e o comprometimento oftalmológico foi avaliada. Apesar de não ser encontrada associação entre a proporção de resultados positivos pelo ELISA e este sinal clínico (Tabela 14), observou-se variação significativa entre as médias de IR de crianças com lesões oculares cicatrizadas e com lesões oculares ativas e cicatrizadas ( $P=0,0374$  – t student seguido de teste F) (Figura 22a). Os valores de mediana de IR entre os grupos não variaram significativamente (Figura 22b).

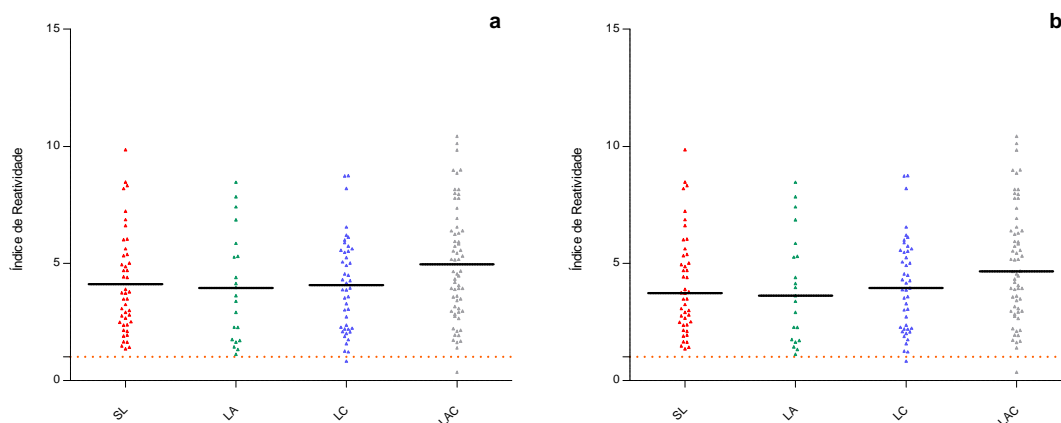


Figura 22. Índice de reatividade de anticorpos IgG totais anti-STAg em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas (b) das determinações (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

**Tabela 14. Associação entre os resultados de ELISA utilizando três antígenos distintos para pesquisa de IgG e subclasses e o diagnóstico clínico de lesão ocular em crianças com toxoplasmose congênita**

	Grupos <sup>a</sup>	IgG total			IgG1			IgG2			IgG3			IgG4		
		OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p
STAg	Grupo LA	0,15	0,00 – 4,03	0,3284	4,88	0,25 – 94,84	0,2943	1,15	0,41 – 3,24	1,0000	1,05	0,37 – 2,92	0,8670	0,49	0,14 – 1,72	0,3807
	Grupo LC	0,32	0,01 – 8,22	1,0000	2,09	0,36 – 12,08	0,6766	1,31	0,56 – 3,05	0,6683	0,63	0,27 – 1,47	0,3986	2,11	0,89 – 5,00	0,1320
	Grupo LAC	0,45	0,01 – 11,51	1,0000	6,04	0,65 – 56,09	0,1582	1,49	0,68 – 3,26	0,4233	0,79	0,36 – 1,71	0,6963	1,36	0,60 – 3,06	0,5858
rSAG1	Grupo LA	1,51	0,05 – 38,78	1,0000	0,46	0,06 – 3,54	0,5927	1,91	0,51 – 7,13	0,4834	2,21	0,40 – 11,98	0,3858	1,77	0,42 – 7,41	0,4615
	Grupo LC	3,067	0,12 – 77,39	1,0000	1,00	0,13 – 7,43	1,0000	1,00	0,29 – 3,37	1,0000	3,02	0,74 – 12,26	0,1966	2,00	0,61 – 6,52	0,3837
	Grupo LAC	4,28	0,17 – 107,6	0,4167	1,41	0,19 – 10,47	1,0000	0,81	0,25 – 2,60	0,7702	2,03	0,50 – 8,14	0,3545	1,50	0,47 – 4,76	0,5792
rMIC3	Grupo LA	0,32	0,06 – 1,58	0,2056	0,97	0,21 – 4,32	1,0000	2,14	0,72 – 6,35	0,2551	2,62	0,91 – 7,53	0,1172	3,33	1,10 – 10,09	0,0383*
	Grupo LC	0,46	0,10 – 1,98	0,4845	2,15	0,50 – 9,21	0,4845	2,95	1,20 – 7,24	0,0287*	1,00	0,43 – 2,32	0,8296	2,50	1,06 – 5,87	0,0339*
	Grupo LAC	0,25 <sup>b</sup>	0,06 – 0,92	0,0335*	1,78	0,50 – 6,25	0,5204	2,81	1,21 – 6,51	0,0247*	1,12	0,51 – 2,44	0,9212	2,68	1,21 – 5,93	0,0228*

<sup>a</sup> Crianças com lesões oculares ativas (LA), com lesões oculares cicatrizadas (LC) e com lesões oculares ativas cicatrizadas (LAC)

<sup>b</sup> Relação inversa

\*Diferença significativa estatisticamente

### 6.5.1.2 IgG1 para STAg

Ao se relacionar os resultados de ELISA-IgG1 para STAg com o diagnóstico clínico oftalmológico, não foram observadas associações significativas (Tabela 14).

Além disso, não houve diferença significativa entre os valores de mediana e média de IR (Figura 23) entre os diferentes grupos estudados.

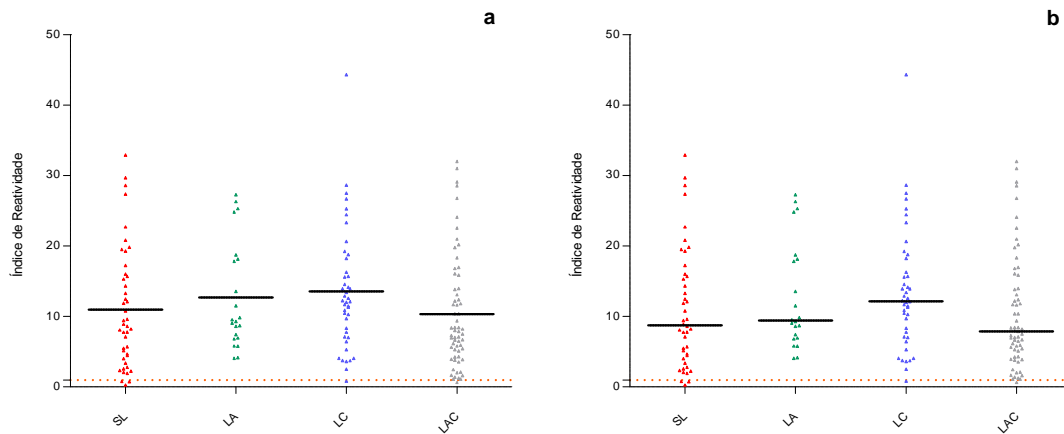


Figura 23. Índice de reatividade de anticorpos IgG1 anti-STAg em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

### 6.5.1.3 IgG2 para STAg

Comparando-se os resultados do ELISA para IgG2 anti-STAg com o diagnóstico clínico oftalmológico das crianças não foram encontradas associações estatisticamente significativas (Tabela 14). Além disso, os valores médios e medianos de IR de crianças com lesões e sem lesões oculares foram semelhantes (Figura 24).

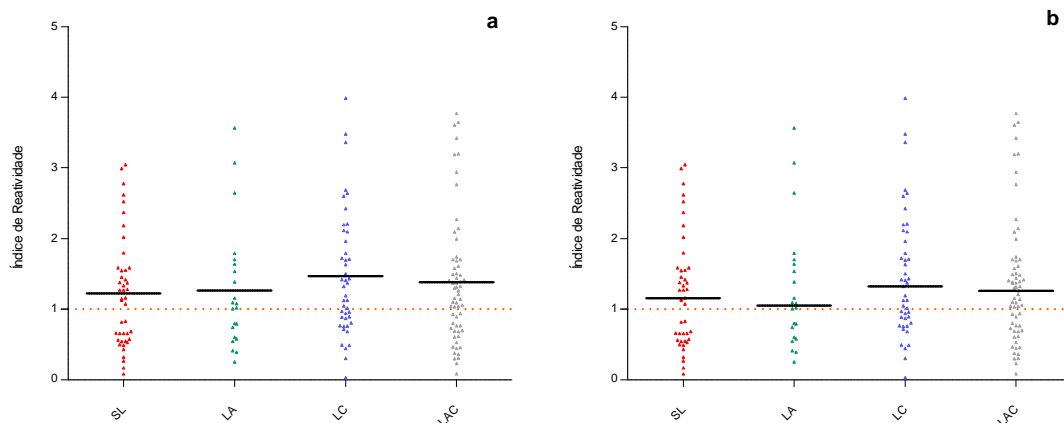


Figura 24. Índice de reatividade de anticorpos IgG2 anti-STAg em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

#### 6.5.1.4 IgG3 para STAg

Comparando-se os resultados do ELISA para IgG3 anti-STAg com o diagnóstico clínico oftalmológico das crianças, não foram encontradas associações estatisticamente significantes (Tabela 14). Os valores médios de IR foram diferentes quando comparou-se o grupo com lesão cicatrizada com grupo sem lesão (figura 25a), enquanto os valores de mediana de IR dos diferentes grupos estudados não variaram significativamente (Figura 25b).

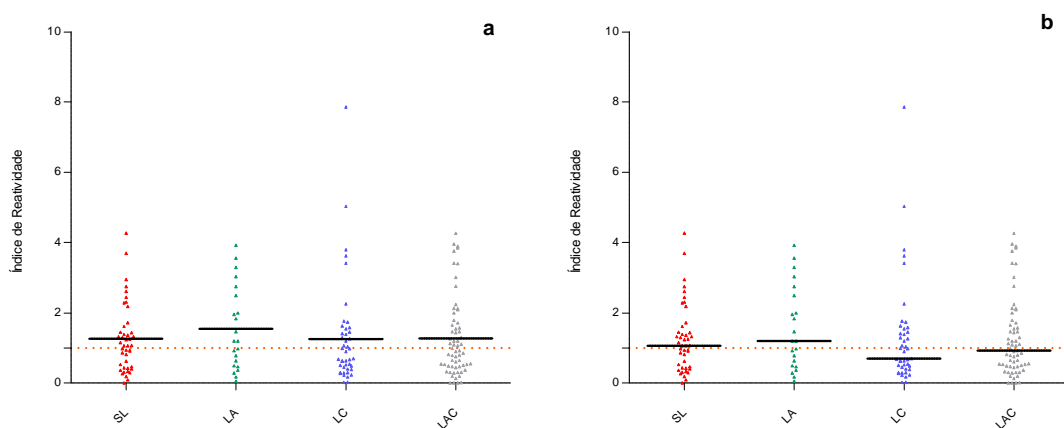


Figura 25. Índice de reatividade de anticorpos IgG3 anti-STAg em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).



### 6.5.1.5 IgG4 para STAg

Comparando-se os resultados do ELISA-IgG4 anti-STAg com o diagnóstico clínico oftalmológico, não foram encontradas associações estatisticamente significantes (Tabela 14).

Apesar disso, os valores médios de IR variaram significativamente entre os grupos SL e LC ( $p=0,026$ ), SL e LAC ( $p=0,030$ ), LA e LC ( $p=0,022$ ) e LA e LAC ( $p=0,026$ ) (Figura 26a). Não houve diferença significativa entre os valores de medianas de IR dos diferentes grupos estudados (Figura 26b).

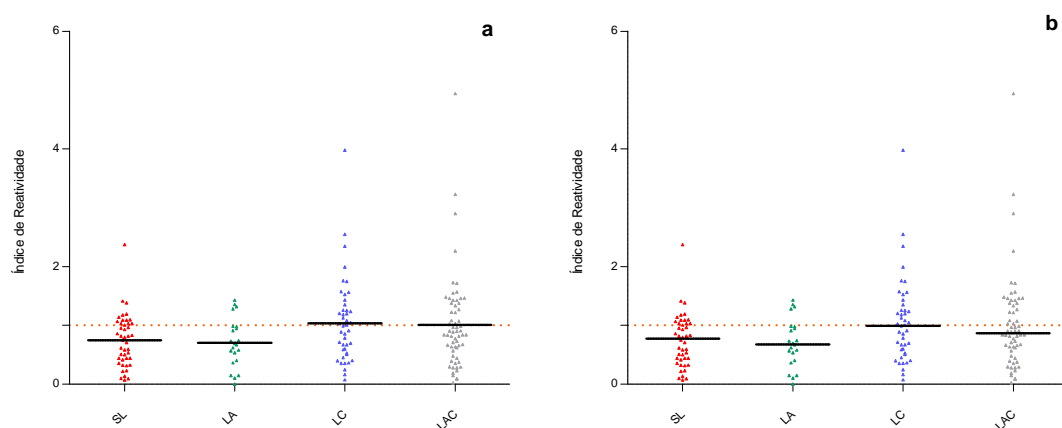


Figura 26. Índice de reatividade de anticorpos IgG4 anti-STAg em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

## 6.5.2 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante SAG1 (rSAG1) de *Toxoplasma gondii*

### 6.5.2.1 IgG Total para rSAG1

Uma associação entre os resultados de ELISA para pesquisa de IgG total utilizando rSAG1 (sorologia positiva ou negativa) e o comprometimento oftalmológico foi avaliada. Apesar de não ser encontrada associação entre o resultado de ELISA e o diagnóstico clínico (Tabela 14), observou-se variação significativa entre as médias de IR de crianças com lesões oculares cicatrizadas e com lesões oculares ativas e

cicatrizadas ( $P=0,0346$ ) (Figura 27a). Os valores de mediana de IR entre os grupos não variaram significativamente (Figura 27b).

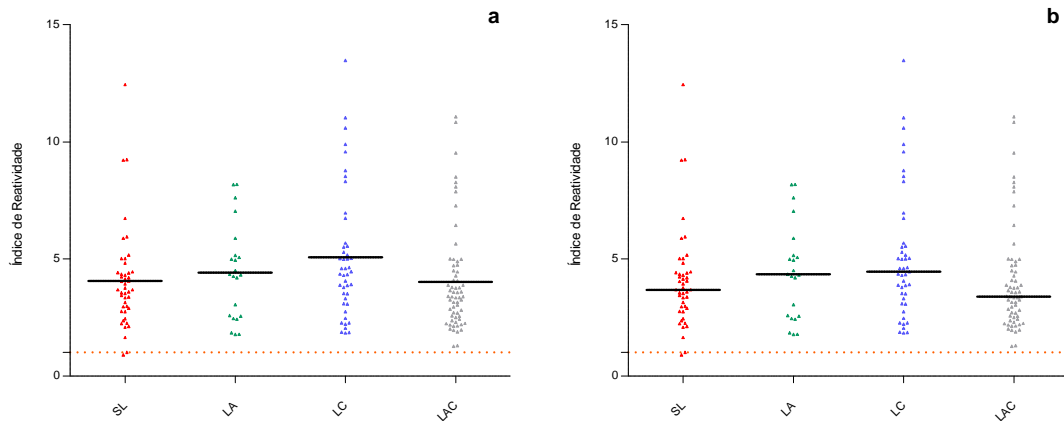


Figura 27. Índice de reatividade de anticorpos IgG totais anti-rSAG1 em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

### 6.5.2.2 IgG1 para rSAG1

Ao se comparar os resultados do ELISA para IgG1 anti-*T. gondii* utilizando rSAG1, com o diagnóstico clínico oftalmológico não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre crianças sem lesões e aquelas com lesões oculares (Tabela 14). Apesar disso, houve diferença significativa entre os valores de média de IR (Figura 28) dos grupos LA e LAC e dos grupos LC e LAC.

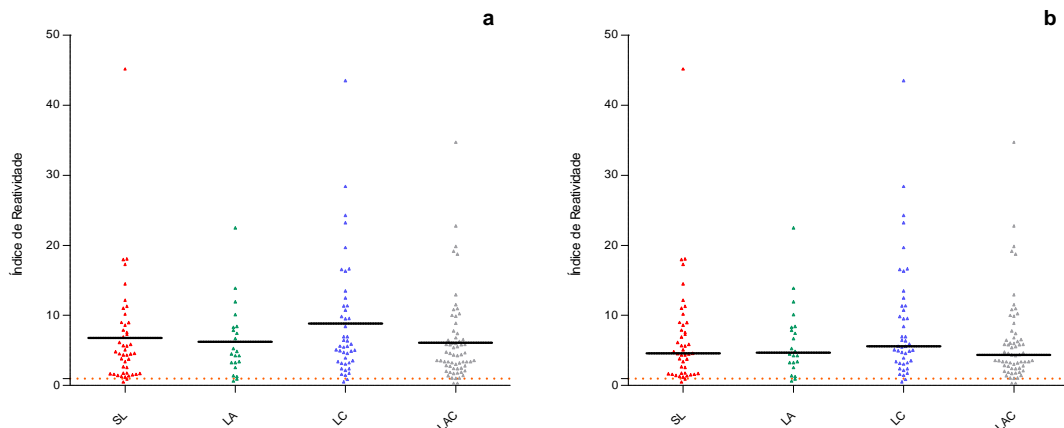


Figura 28. Índice de reatividade de anticorpos IgG1 anti-rSAG1 em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

### 6.5.2.3 IgG2 para rSAG1

Comparando-se os resultados da sorologia para IgG2 anti-*rSAG1* com o diagnóstico clínico oftalmológico das crianças, não foram encontradas associações estatisticamente significantes (Tabela 14). Além disso, as médias e medianas do IR de crianças com lesões e sem lesões oculares foram semelhantes, exceto na comparação das médias de IR entre os grupos LC e LAC (Figura 29).

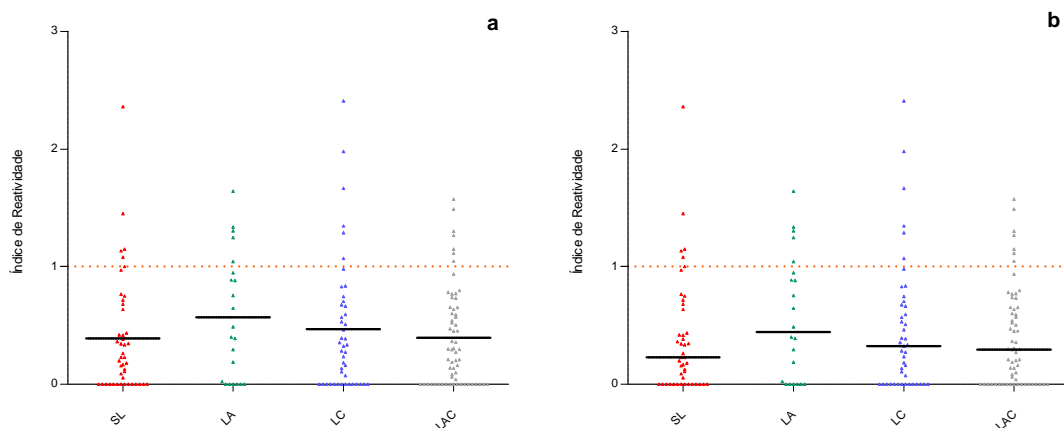


Figura 29. Índice de reatividade de anticorpos IgG2 anti-*rSAG1* em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

### 6.5.2.4 IgG3 para rSAG1

Comparando-se os resultados da sorologia para IgG3 anti-*rSAG1* com o diagnóstico clínico oftalmológico, não foram encontradas associações estatisticamente significantes (Tabela 14). Além disso, os valores médios de IR de crianças com lesões e sem lesões oculares foram semelhantes (Figura 30a), exceto entre as médias dos grupos LC e LAC ( $p=0,0355$ ). Os valores de mediana de IR entre estes grupos também foram distintos estatisticamente ( $p=0,0148$ ), sendo que pelo teste de Dunns também foi observada diferença entre a mediana dos grupos LC e LAC (Figura 30b).

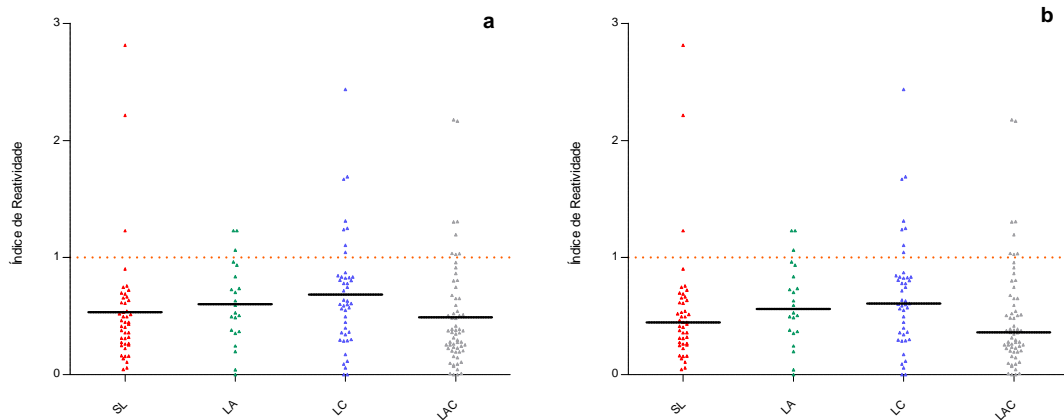


Figura 30. Índice de reatividade de anticorpos IgG3 anti-rSAG1 em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

### 6.5.2.5 IgG4 para rSAG1

Comparando-se os resultados da sorologia para IgG4 anti-rSAG1 com o diagnóstico clínico oftalmológico das crianças, não foram encontradas associações estatisticamente significantes (Tabela 14). Também não houve diferença significativa entre os valores de médias e medianas de IR dos diferentes grupos estudados (Figura 31).

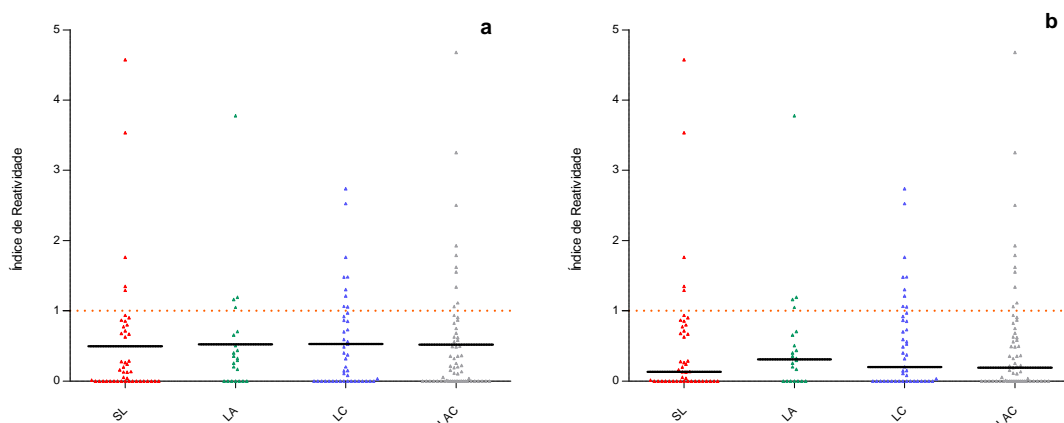


Figura 31. Índice de reatividade de anticorpos IgG4 anti-rSAG1 em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

### 6.5.3 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante MIC3 (rMIC3) de *Toxoplasma gondii*

#### 6.5.3.1 IgG Total para rMIC3

Quando o antígeno recombinante rMIC3 foi utilizado, observou-se que 46% das crianças com sorologia positiva para IgG total não apresentavam lesão ocular (42/91), enquanto 17% daquelas com sorologia negativa também não apresentavam lesões (3/17). A diferença entre essas proporções foi considerada estatisticamente significativa (Tabela 14), sendo que crianças sem lesões oculares são 4 vezes mais prováveis de apresentarem um resultado positivo para IgG total utilizando rMIC3 quando comparadas com crianças com lesões ativas e cicatrizadas.

Apesar disso, não houve diferença significativa entre os valores de médias e medianas de IR dos grupos com e sem lesões oculares (Figura 32).

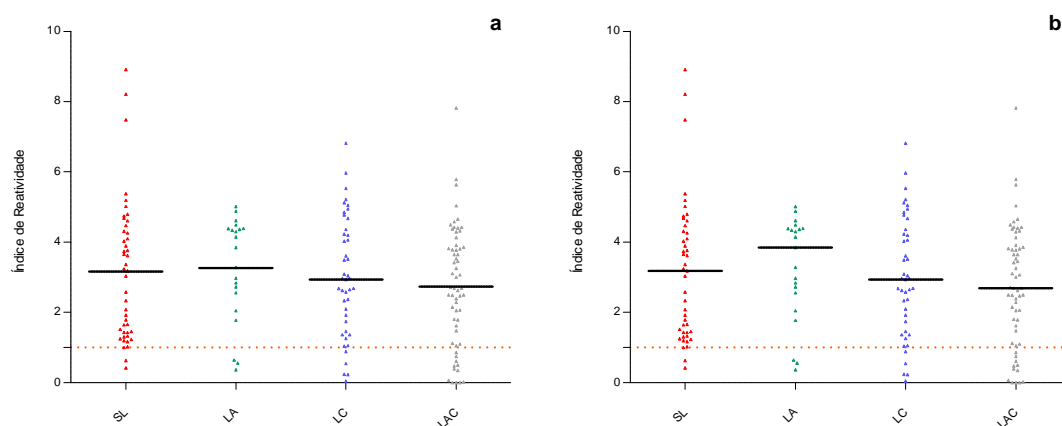


Figura 32. Índice de reatividade de anticorpos IgG totais anti-rMIC3 em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

#### 6.5.3.2 IgG1 para rMIC3

Na análise comparativa dos resultados de ELISA com o diagnóstico clínico não foram observadas associações entre os grupos (Tabela 14).

As médias de IR variaram significativamente quando se comparou o grupo SL com os grupos LA, LC e LAC ( $P=0,013$ ,  $P=0,020$  e  $P=0,046$ , respectivamente) (Figura

33a). No entanto, na comparação das medianas de IR entre os grupos, não foram observadas diferenças estatísticas significantes ( $P=0,1608$ ) (Figura 33b).

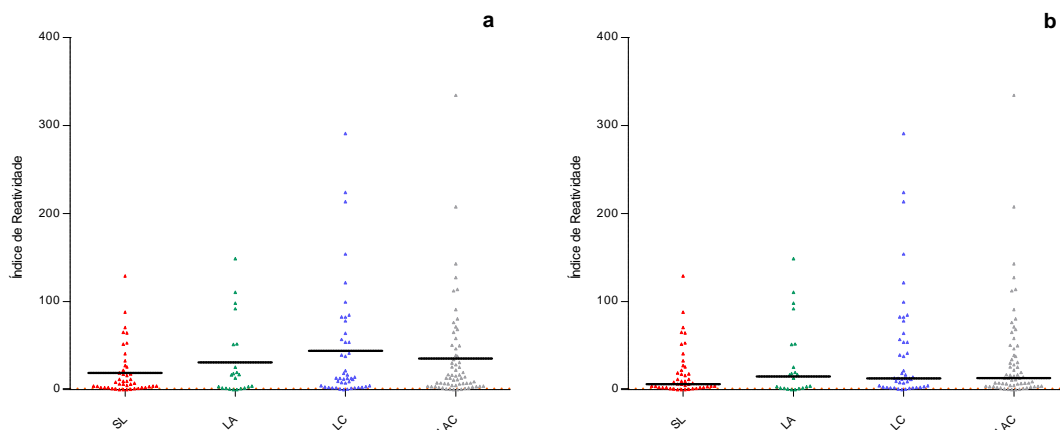


Figura 33. Índice de reatividade de anticorpos IgG1 anti-rMIC3 em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

### 6.5.3.3 IgG2 para rMIC3

Na análise comparativa dos resultados de ELISA com o diagnóstico clínico de crianças com LC e SL, observou-se que 66% das crianças com sorologia positiva apresentavam lesões oculares cicatrizadas (22/33), enquanto 40% daquelas com sorologia negativa também apresentavam tais lesões (23/57). Já na comparação dos resultados de ELISA de crianças com lesões ativas e cicatrizadas com crianças sem lesões, observou-se que 73% daquelas com sorologia positiva tinham LAC (30/41), enquanto 49% daquelas com sorologia negativa também apresentavam o mesmo padrão de lesões (33/67). A diferença entre as proporções destes grupos foi considerada estatisticamente significativa (Tabela 14). Portanto, crianças com lesões cicatrizadas são 2,95 mais prováveis de apresentarem sorologia positiva para IgG2 em teste de ELISA utilizando rMIC3, quando comparadas com crianças sem lesões oculares. Ainda, crianças com lesões ativas e cicatrizadas são 2,81 mais prováveis de apresentarem sorologia positiva, ao serem comparadas com crianças sem lesões (Tabela 14).

Comparando-se as médias de IR dos diferentes grupos, foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, SL e LC, SL e LAC, LA e LC, LA e LAC e LC e LAC ( $p=0,020$ ,  $p=0,011$ ,  $p=0,037$ ,  $p=0,021$  e  $p=0,028$ , respectivamente) (Figura 34a). Os valores de mediana de IR foram estatisticamente distintos entre os grupos, sendo que

ao se comparar os pares de grupos pelo teste de Dunns, diferença estatística significativa foi observada entre os grupos SL e LAC (Figura 34b).

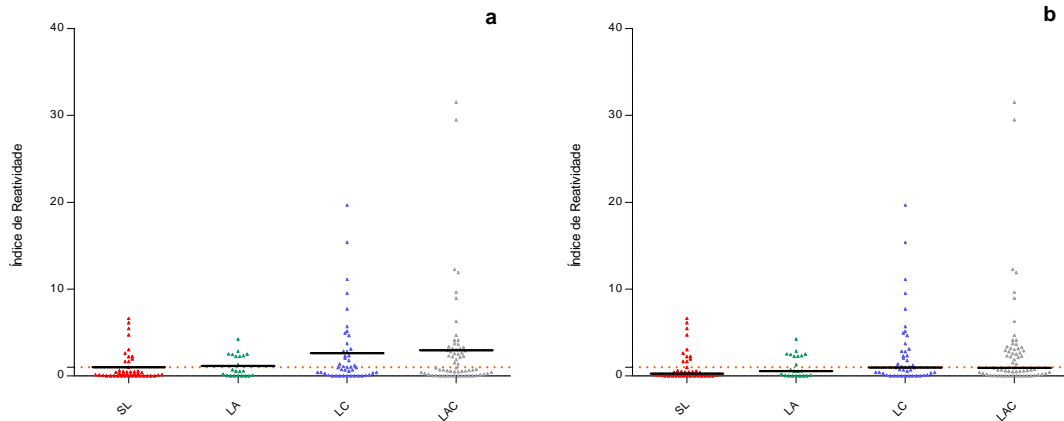


Figura 34. Índice de reatividade de anticorpos IgG2 anti-rMIC3 em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

### 6.5.3.3 IgG3 para rMIC3

Comparando-se os resultados da sorologia para IgG3 anti-rMIC3 com o diagnóstico clínico oftalmológico das crianças, não foram encontradas associações estatisticamente significantes (Tabela 14).

Porém, observou-se que os valores médios de IR entre os grupos SL e LA, SL e LAC, LA e LC e LC e LAC foram estatisticamente distintos, enquanto as diferenças entre as medianas de IR não foram diferentes entre os grupos (Figura 35).

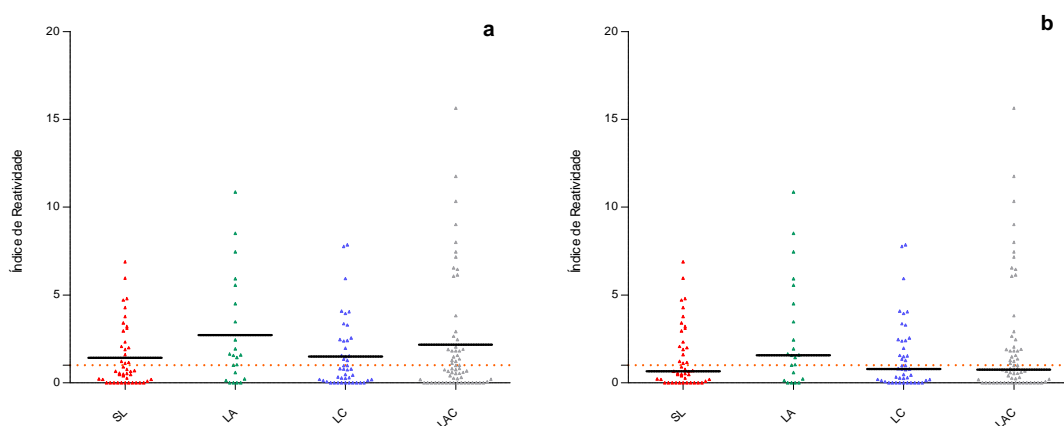


Figura 35. Índice de reatividade de anticorpos IgG3 anti-rMIC3 em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).

### 6.5.3.5 IgG4 para rMIC3

Na análise comparativa dos resultados de ELISA com o diagnóstico clínico, ao se comparar os grupos LA e SL, observou-se que 44% das crianças com sorologia positiva apresentavam lesões oculares ativas (16/36), enquanto 19% daquelas com sorologia negativa também apresentavam o mesmo padrão de lesões (6/31). Ao se fazer comparação entre crianças SL e com LC, 60% de crianças apresentava sorologia positiva com lesão cicatrizada (30/50), enquanto 37% de crianças com sorologia negativa apresentavam o mesmo tipo de lesão (15/40). Já na comparação dos resultados de ELISA de crianças com lesões ativas e cicatrizadas com crianças sem lesões, observou-se que 68% daquelas com sorologia positiva tinham LAC (43/63), enquanto 44% daquelas com sorologia negativa também apresentavam o mesmo padrão de lesões (20/45). A diferença entre essas proporções foi considerada estatisticamente significativa (Tabela 14). Portanto, crianças com lesões oculares têm maiores probabilidades de apresentarem sorologia positiva para IgG4 anti-rMIC3 do que crianças sem lesões.

As médias de IR foram diferentes significativamente entre os grupos SL e LA, SL e LC, SL e LAC e entre os grupos LA e LAC ( $P=0,013$ ,  $P=0,017$ ,  $P=0,002$  e  $P=0,021$ , respectivamente) (Figura 36a). Os valores de mediana de IR foram estatisticamente distintos, sendo que maiores diferenças foram observadas entre os grupos SL e LC e SL e LAC (Figura 36b).

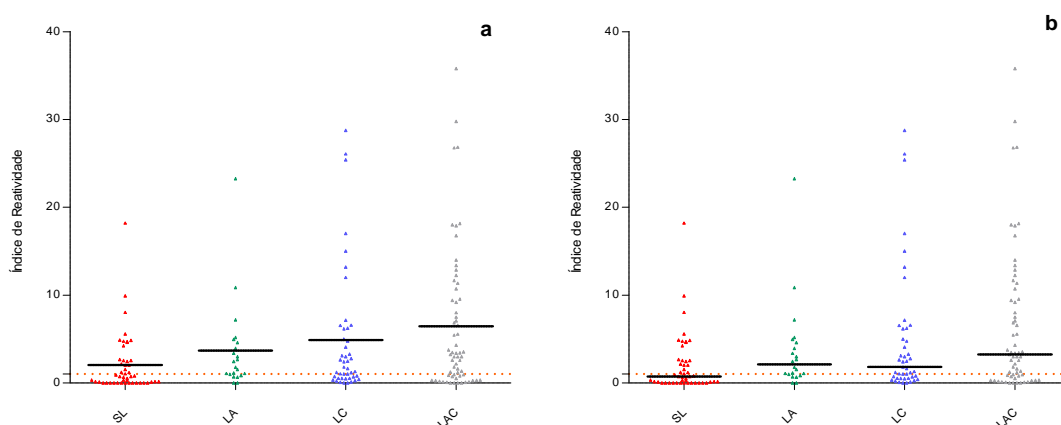


Figura 36. Índice de reatividade de anticorpos IgG4 anti-rMIC3 em crianças com lesão ocular e sem lesão ocular devido à toxoplasmose congênita. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às (a) e medianas das determinações (b) (SL: sem lesão ocular; LA: lesão ocular ativa; LC: lesão ocular cicatrizada; LAC: lesão ocular ativa e cicatrizada).



## **6.6 Associação dos Resultados do ELISA e a Avaliação Auditiva em Crianças com Toxoplasmose Congênita**

As análises de associação entre resultados do ELISA e audição alterada foram realizadas para apenas 109 crianças entre as 175 com toxoplasmose congênita confirmada. Em 66 crianças não foi possível fazer os exames auditivos. As 69 crianças infectadas mas sem deficiência auditiva foram consideradas como referência na análise auditiva.

### **6.6.1 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígenos Solúveis Totais (STAg) de *Toxoplasma gondii***

Uma associação entre os resultados de ELISA para pesquisa de IgG total para STAg e a avaliação auditiva foi estudada, não sendo observada diferença estatística significativa através do teste exato de Fischer (Tabela 15). Semelhantemente, as médias de IR não apresentaram diferença estatística significativa ( $P=0,8194$ ) em crianças com sorologia positiva para toxoplasmose, com ou sem déficit auditivo (Figura 37).

Resultados semelhantes foram observados para as demais subclasses de IgG (Tabela 15). Além disso, os valores médios e de medianas de IR em crianças com e sem déficit auditivo não foram diferentes ao nível de significância de 5%, exceto na comparação das médias de IR para IgG3 e IgG4 (Figura 37).

Tabela 15. Associação entre os resultados de ELISA para pesquisa de subclasses de IgG utilizando proteínas totais e recombinantes de *T. gondii* e a avaliação clínica auditiva em crianças com toxoplasmose congênita

Antígeno	IgG total			IgG1			IgG2			IgG3			IgG4		
	OR	IC 95%	P	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p
STAg	0,18	0,007 – 4,76	0,3670	0,56	0,07 – 4,19	0,6233	0,90	0,40 – 2,01	0,9716	0,80	0,36 – 1,75	0,7230	1,11	0,49 – 2,45	0,9716
rSAG1	- <sup>a</sup>	-	-	9,72	0,53 – 175,0	0,0457*	2,89	1,05 – 7,96	0,0643	0,98	0,26 – 3,59	1,0000	1,17	0,38 – 3,59	0,7797
rMIC3	0,33	0,11 – 0,97	0,0549	1,52	0,44 – 5,22	0,5672	0,51	0,21 – 1,23	0,1964	0,79	0,35 – 1,81	0,7364	0,96	0,43 – 2,13	0,9094

<sup>a</sup> indeterminado devido a ausência de resultados negativos na sorologia

\* Diferença significativa estatisticamente

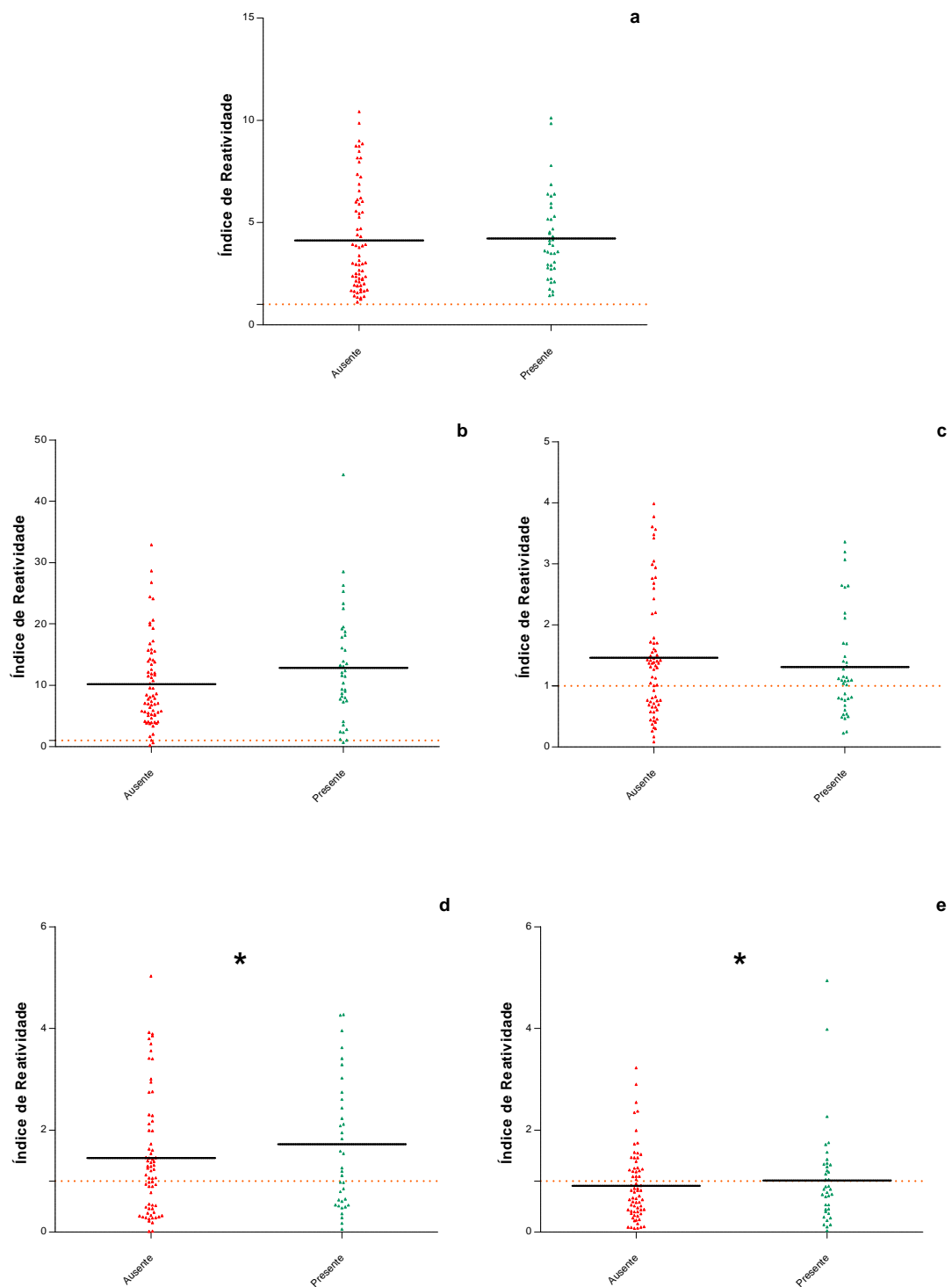


Figura 37. Índice de reatividade de anticorpos IgG e suas subclasses anti-STAg de *T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita com déficit auditivo ausente ou presente. a. IgG total ; b. IgG1; c. IgG2; d. IgG3; e. IgG4. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias das determinações. Asterisco indica médias significativamente diferentes.

### **6.6.2 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante SAG1 (rSAG1) de *Toxoplasma gondii***

Quando o antígeno recombinante rSAG1 foi utilizado, observou-se diferença estatística significativa ( $P=0,0457$ ) entre as proporções de crianças com sorologia positiva para IgG1 anti-rSAG1 as quais apresentavam déficit auditivo e aquelas sem alterações auditivas (Tabela 15). Cerca de 40% das crianças que apresentaram sorologia positiva (40/102) tinham alterações auditivas, enquanto 100% daquelas com sorologia negativa (7/7) não tinham alterações. Apesar disso, de acordo com o intervalo de confiança da *odds ratio*, não se pode afirmar que a diferença entre essas proporções tem significado estatístico (Tabela 15).

Para as demais subclasses não foram observadas diferenças significativas entre os resultados de ELISA para rSAG1 e o déficit auditivo.

Apesar disso, diferenças entre os valores médios de IR somente foram observados entre crianças com e sem déficit auditivo testadas para IgG4 (Figura 38), enquanto que os valores de medianas foram semelhantes entre estes dois grupos, tanto para IgG total, como para as subclasses.

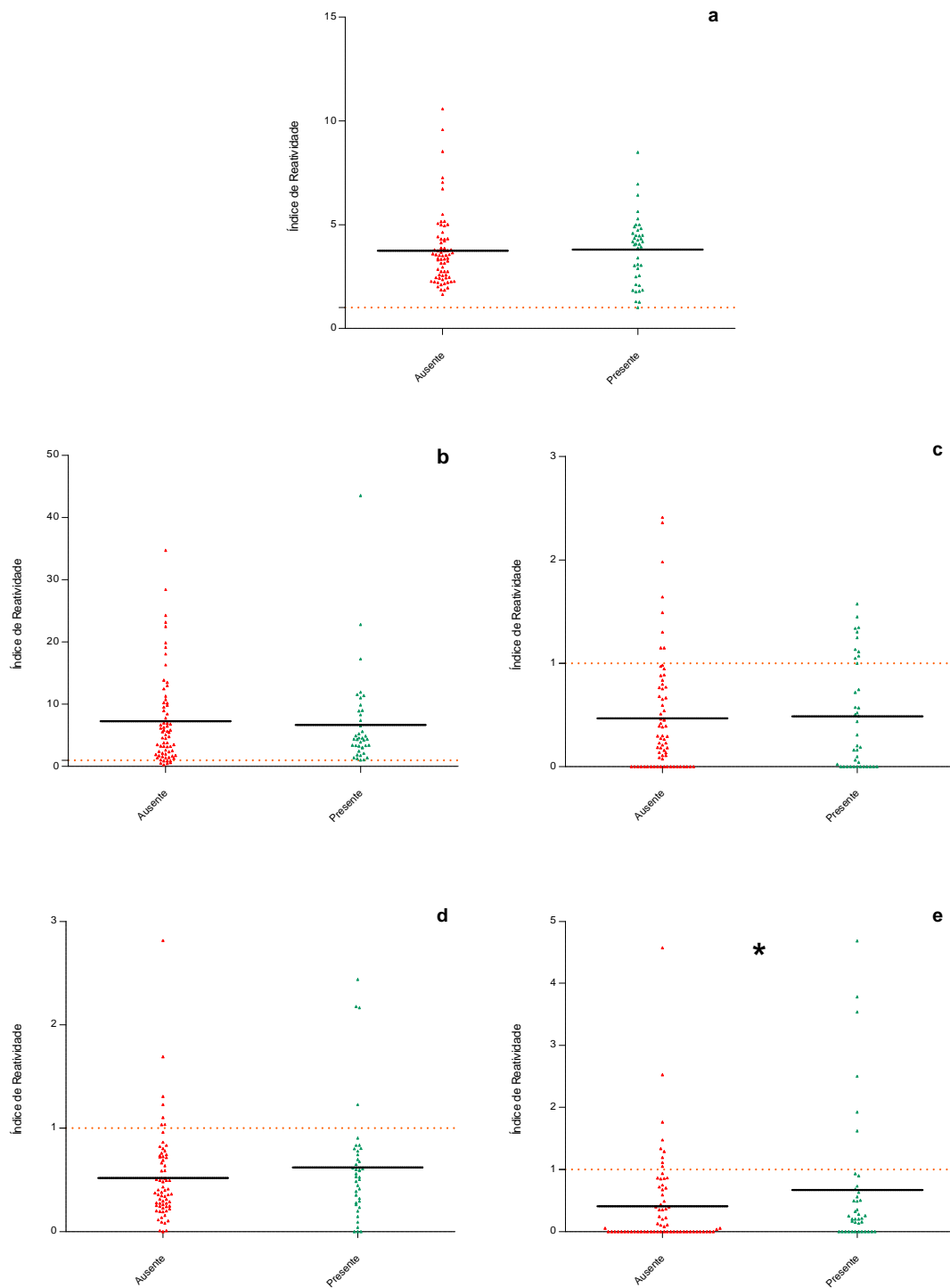


Figura 38. Índice de reatividade de anticorpos IgG e suas subclasses anti-rSAG1 de *T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita com déficit auditivo ausente ou presente. a. IgG total ; b. IgG1; c. IgG2; d. IgG3; e. IgG4. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias das determinações. Asterisco indica médias significativamente diferentes.

### **6.6.3 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante MIC3 (rMIC3) de *Toxoplasma gondii***

Quando o antígeno recombinante rMIC3 foi utilizado, não foi observada diferença estatística significativa na proporção de crianças com sorologia positiva para IgG total entre o grupo que apresentava déficit auditivo e as crianças sem alterações auditivas (Tabela 15). O mesmo foi observado quando foram analisadas as diferentes subclasses de IgG para rMIC3.

Apesar disso, os valores médios de IR apresentaram diferença significativa entre os grupos ao se pesquisar IgG1 e IgG4 (Figura 39). Já os valores de mediana de IR entre os grupos não apresentaram diferença significativa.

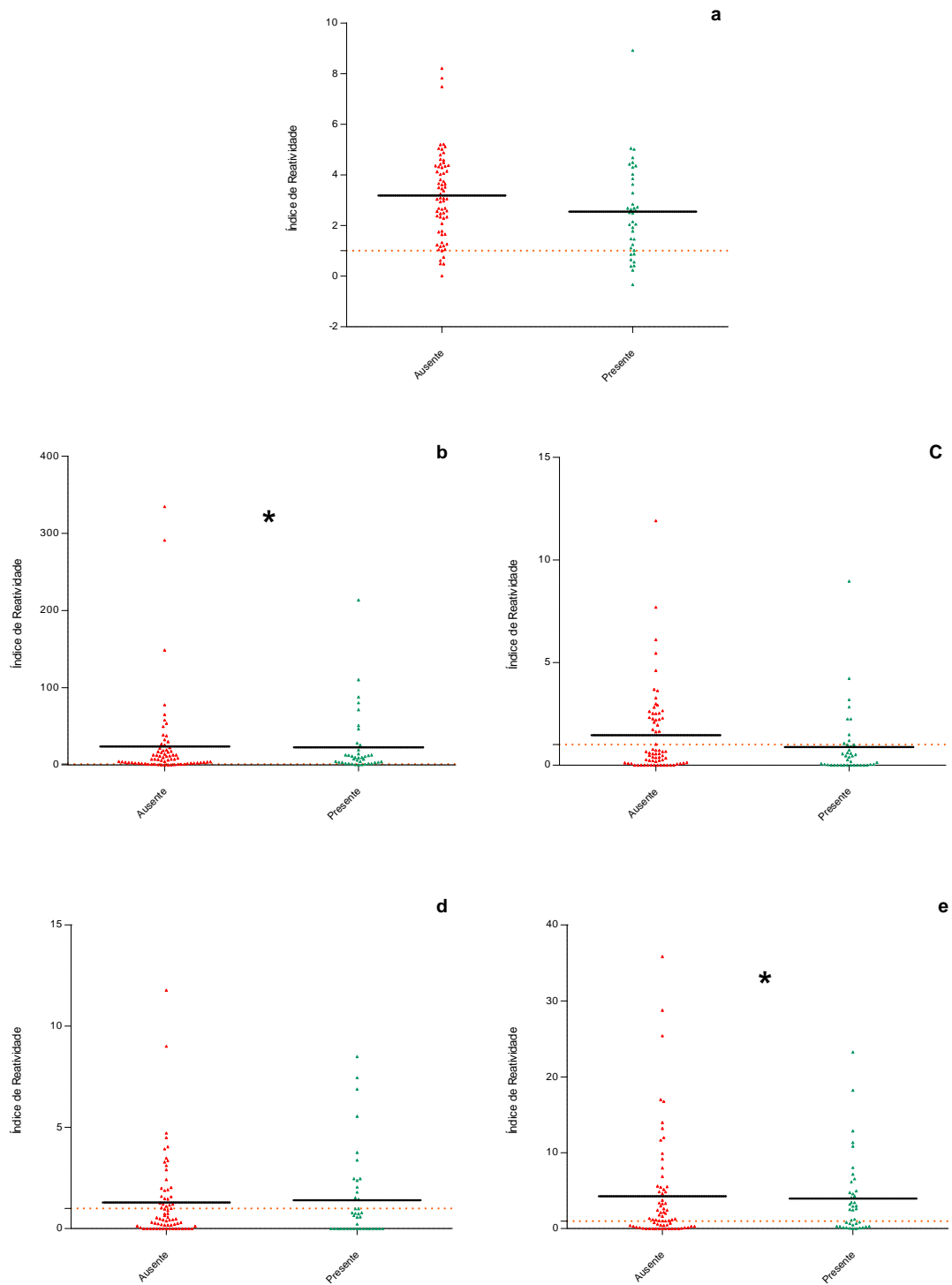


Figura 39. Índice de reatividade de anticorpos IgG e suas subclasses anti-rMIC3 de *T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita com déficit auditivo ausente ou presente. a. IgG total ; b. IgG1; c. IgG2; d. IgG3; e. IgG4. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias das determinações. Asterisco indica médias significativamente diferentes.

## **6.7 Associação dos Resultados do ELISA e o Diagnóstico de Alterações Neurológicas (Calcificações Cerebrais) em Crianças com Toxoplasmose Congênita**

As análises de associação entre resultados do ELISA e alterações neurológicas foram realizadas para apenas 156 crianças entre as 175 com toxoplasmose congênita confirmada. Em 19 crianças não foi possível fazer os exames neurológicos. Vinte crianças apresentaram calcificações cerebrais. As 136 crianças infectadas mas sem calcificações cerebrais foram consideradas como referência na análise neurológica.

### **6.7.1 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígenos Solúveis Totais (STAg) de *Toxoplasma gondii***

Uma associação entre os resultados de ELISA para pesquisa de IgG total utilizando STAg e o diagnóstico de alterações neurológicas foi avaliada, não sendo observada diferença estatística significativa através do teste exato de Fischer (Tabela 15). Apenas para a subclasse IgG3 foi observada associação entre a sorologia e as alterações clínicas. As crianças com alterações neurológicas apresentaram cerca de 32% menos chance de serem positivas para IgG3 quando comparadas com aquelas sem alterações (Tabela 16).

As médias de IR apresentaram diferença estatística significativa entre crianças com e sem alterações neurológicas ao se pesquisar as subclasses IgG3 e IgG4 ( $p=0,0016$  e  $p=0,018$ , respectivamente) (Figura 40). Diferença significativa também foi observada para os valores de mediana entre as crianças com e sem alterações neurológicas ao se pesquisar IgG3 ( $p=0,0054$ ).



**Tabela 16. Associação entre os resultados de ELISA para pesquisa de subclasses de IgG utilizando proteínas totais e recombinantes de *T. gondii* e o diagnóstico de alterações neurológicas em crianças com toxoplasmose congênita**

Antígenos	IgG total			IgG1			IgG2			IgG3			IgG4		
	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p
STAg	1,12	0,05 – 22,61	1,000	2,49	0,13 – 45,24	0,5949	0,70	0,27 – 1,76	0,6077	0,32	0,11 – 0,88	0,0334*	1,12	0,43 – 2,91	0,8104
rSAG1	0,47	0,01 – 12,08	1,000	0,92	0,10 – 8,07	1,0000	0,30	0,03 – 2,43	0,4784	1,09	0,29 – 4,08	1,0000	0,27	0,03 – 2,15	0,2738
rMIC3	1,22	0,33 – 4,49	1,000	4,70	0,26 – 82,10	0,2183	5,68	1,96 – 16,46	0,0007*	1,43	0,57 – 3,60	0,5918	4,07	1,14 – 14,50	0,0273*

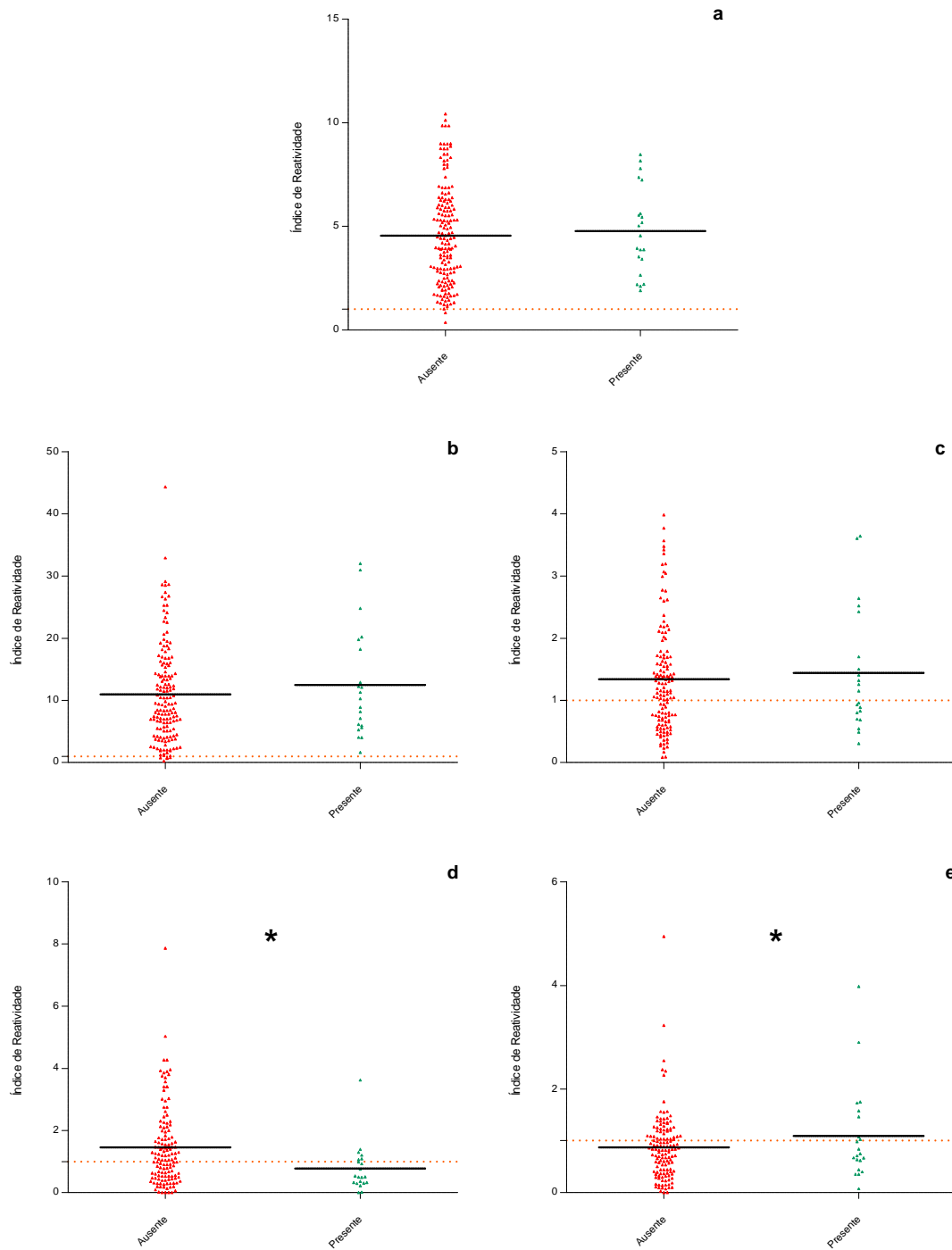


Figura 40. Índice de reatividade de anticorpos IgG e suas subclasses anti-STAg de *T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita com alterações neurológicas ausente ou presente. a. IgG total ; b. IgG1; c. IgG2; d. IgG3; e. IgG4. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias das determinações. Asterisco indica médias significativamente diferentes.

### **6.7.2 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante SAG1 (rSAG1) de *Toxoplasma gondii***

Quando o antígeno recombinante rSAG1 foi utilizado, não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre crianças com sorologia positiva para IgG total e para as subclasses de IgG anti-rSAG1 as quais apresentavam alterações neurológicas e aquelas sem alterações (Tabela 16).

Apesar disso, os valores médios de IR nos grupos de crianças com e sem alterações neurológicas apresentaram diferença significativa ao se pesquisar anticorpos IgG1 ( $p=0,0162$ ) e anticorpos IgG2 ( $p= 0,0328$ ) (Figura 41), enquanto os valores de mediana foram distintos para IgG2 ( $p=0,0325$ ) e IgG4 ( $p=0,0321$ ).

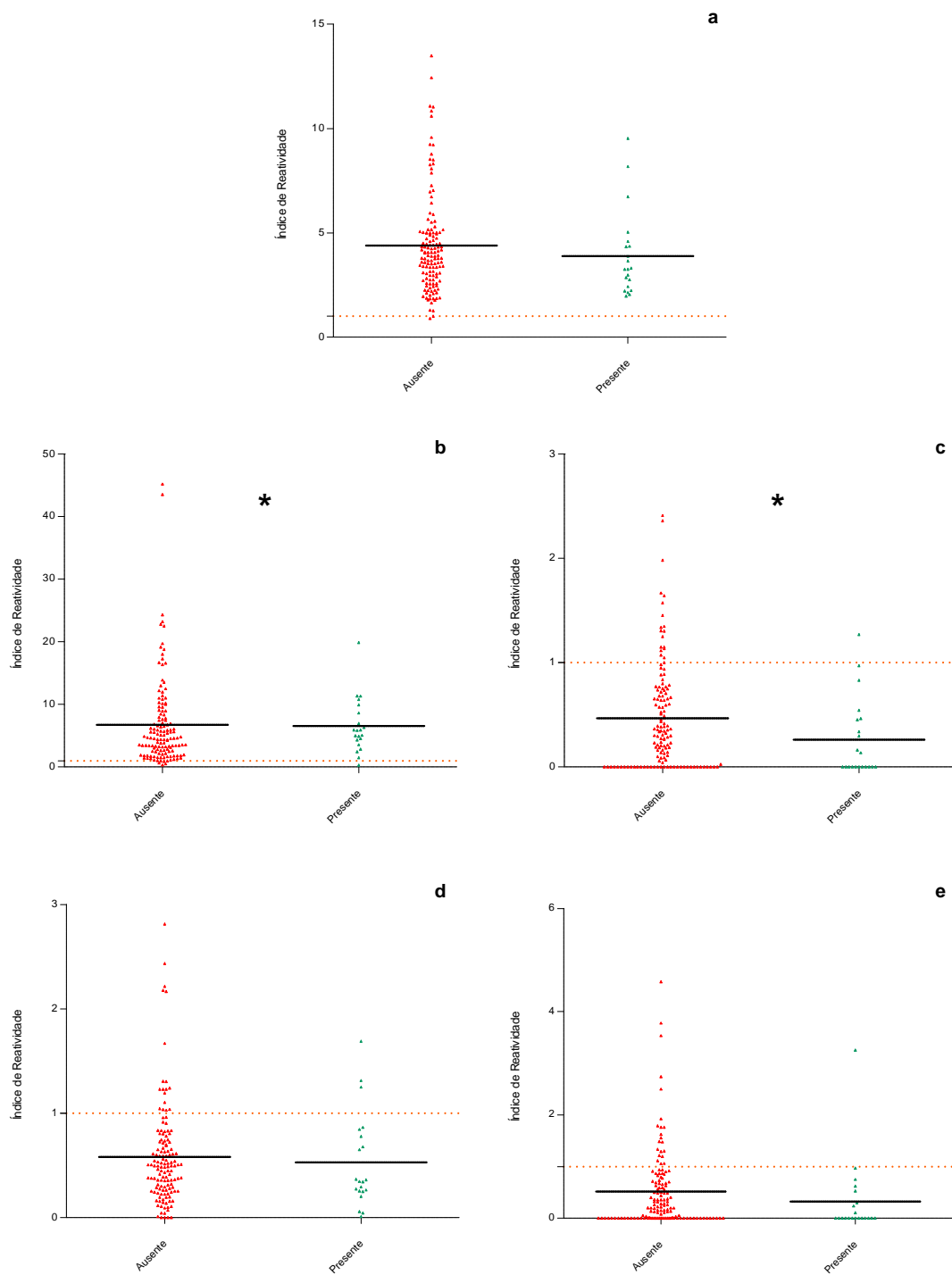


Figura 41. Índice de reatividade de anticorpos IgG e suas subclasses anti-rSAG1 de *T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita com alterações neurológicas ausente ou presente. a. IgG total ; b. IgG1; c. IgG2; d. IgG3; e. IgG4. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias das determinações. Asterisco indica médias significativamente diferentes.

### **6.7.3 Associação dos Resultados de ELISA Utilizando Antígeno Recombinante MIC3 (rMIC3) de *Toxoplasma gondii***

Quando o antígeno recombinante rMIC3 foi utilizado, observou-se diferença estatística significativa ( $P=0,0007$ ) entre crianças com sorologia positiva para IgG2 anti-rMIC3 as quais apresentavam alterações neurológicas e aquelas sem alterações (Tabela 15). Cerca de 24% das crianças que apresentaram sorologia positiva (16/65) tinham alterações neurológicas, enquanto 5% daquelas com sorologia negativa (5/92), também tinham alterações. As crianças com alterações neurológicas tiveram 5,68 vezes mais chance de apresentar sorologia positiva para IgG2 anti-rMIC3 do que aquelas sem alterações (Tabela 16).

Crianças com sorologia positiva para IgG4 também apresentaram diferença significativa ( $P=0,0273$ ) entre aquelas que possuíam alterações neurológicas e aquelas sem alterações. Cerca de 18% das crianças com sorologia positiva (18/99) apresentavam alterações neurológicas, enquanto 5% (3/58) das crianças com sorologia negativa também apresentavam alterações. Crianças com alterações neurológicas tiveram 4,07 vezes mais chances de apresentarem resultados positivos para IgG4 anti-rMIC3 quando comparadas com aquelas sem alterações neurológicas.

Os valores médios de IR dos grupos apresentaram diferença significativa entre os grupos ao se pesquisar anticorpos IgG1, IgG2 e IgG4 ( $P<0,0001$   $P=0,0192$  e  $P=0,0049$ , respectivamente) (Figura 42). O mesmo foi observado para os valores de mediana de IR para IgG1 ( $p=0,0024$ ), IgG2 ( $p=0,0007$ ) e IgG4 ( $p=0,0002$ ).

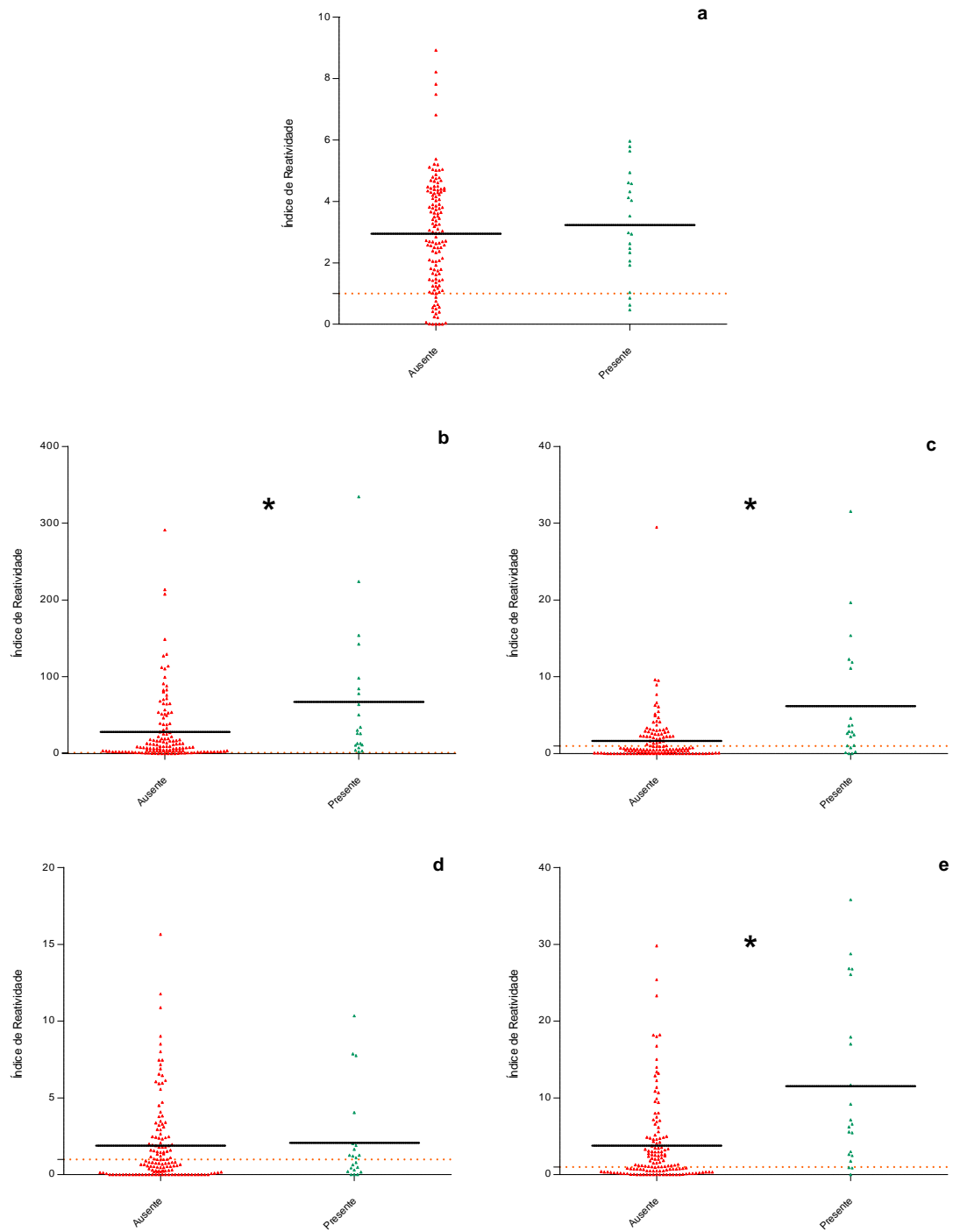


Figura 42. Índice de reatividade de anticorpos IgG e suas subclasses anti-rMIC3 de *T. gondii* em crianças com toxoplasmose congênita com alterações neurológicas ausente ou presente. a. IgG total ; b. IgG1; c. IgG2; d. IgG3; e. IgG4. A linha horizontal pontilhada corresponde ao ponto de corte da reação. As linhas horizontais contínuas correspondem às médias das determinações. Asterisco indica médias significativamente diferentes.

## **7. DISCUSSÃO**

A realização de um teste sensível e específico capaz de distinguir, logo após o nascimento, uma criança com toxoplasmose congênita e uma criança não-infectada, é importante para estabelecer os cuidados necessários ao recém-nascido (BUFFOLANO *et al.*, 2005). Em 20% a 30% dos casos de infecção aguda materna o parasito atravessa a placenta (DUNN, *et al.*, 1999; LEBECH *et al.*, 1999). Portanto, é importante a realização de testes diagnósticos em recém-nascidos para a exclusão daqueles não-infectados, a fim de se evitar a aplicação de um tratamento desnecessário nestes, além de minimizar ou até mesmo evitar, em crianças com toxoplasmose congênita, as seqüelas provocadas pela infecção (BUFFOLANO *et al.*, 2005).

O padrão-ouro do diagnóstico da toxoplasmose congênita é a realização de testes sorológicos nas crianças após 12 meses, quando se observa um declínio ou permanência dos níveis de anticorpos IgG para *T. gondii* no organismo (RILLING, *et al.*, 2003; MONTOYA & LIESENFELD, 2004; SENSINI, 2006; MACHADO *et al.*, 2010). Porém, PETERSEN (2007) afirma que a presença de anticorpos maternos na criança, associado ao tratamento contínuo com sulfadiazina e pirimetamina, podem mascarar e retardar a produção de imunoglobulinas pelo recém-nascido, e consequente confirmação da infecção (PETERSEN, 2007). Devido ao fato de não haver um método diagnóstico que possa excluir ou indicar com absoluta certeza a infecção por *T. gondii*, no presente estudo optou-se por utilizar a persistência de IgG após 12 meses, como teste de referência.

No presente trabalho foram testados diferentes variáveis para a realização do teste de ELISA indireto em plasmas coletados de crianças com aproximadamente 2 meses de vida, a fim de buscar uma alternativa para o diagnóstico precoce de



toxoplasmose em recém-nascidos. Para isso foram testados três diferentes antígenos (STAg, rMIC3 e rSAG1) para a detecção de anticorpos IgG e suas subclasses.

### **7.1 Sensibilidade e Especificidade do ELISA em 217 recém-nascidos com suspeita de toxoplasmose congênita**

Os anticorpos IgG das 217 crianças com suspeita de toxoplasmose congênita reagiram tanto com os antígenos totais de *T. gondii* (STAg) quanto com as proteínas recombinantes SAG1 (rSAG1) e MIC3 (rMIC3). A sensibilidade para IgG total oscilou entre 86% e 99%. Apesar disso a especificidade do teste variou entre 7% e 35%, dependendo do antígeno utilizado. Ao serem comparadas as proporções de amostras reativas de recém-nascidos infectados e aqueles não-infectados, observou-se diferença significativa ao se utilizar antígenos recombinantes. Isto também foi observado por BUFFOLANO *et al.* (2005), sendo que ao utilizarem antígenos recombinantes em teste de ELISA para pesquisa de IgG mais de 75% das amostras de crianças infectadas reagiram, sendo diferenciadas estatisticamente daquelas não-infectadas.

Para a subclasse IgG1, observou-se comportamento semelhante, com valores de sensibilidade acima de 90% dos casos, porém, com especificidade variando entre 16% (para STAg) e 69% (para rMIC3). Além disso, a proporção de crianças infectadas que se apresentaram positivas no teste de ELISA foi diferente daquelas não infectadas.

Todos os testes para IgG total e IgG1 apresentaram alta sensibilidade e baixa especificidade, indicando que são capazes de identificar os indivíduos positivos, mas não conseguem diferenciar os recém-nascidos não-infectados (apenas com anticorpos maternos adquiridos passivamente). Ainda assim, as razões de verossimilhança negativas são baixas, principalmente para a pesquisa de IgG total e IgG1, os quais

indicam que a probabilidade de uma criança que apresentou um teste negativo não estar infectada é alta. Isto é observado principalmente quando é utilizado rSAG1 para pesquisa de anticorpos IgG totais.

Porém, os altos níveis de IgG, principalmente IgG1 encontrados nos recém-nascidos podem ser explicados pela transferência passiva de anticorpos maternos durante a gestação, os quais decrescem após o nascimento (SIMISTER, 2003; BUFFOLANO *et al.*, 2005; CORREA *et al.*, 2007, PETERSEN, 2007).

A pesquisa das subclasses IgG2, IgG3 e IgG4 foram acessadas, apresentando maior índice de especificidade (apesar da baixa sensibilidade) e maiores razões de verossimilhança positiva no ELISA em comparação com IgG total. Estes dados demonstram que as crianças com reação positiva no teste, muito provavelmente estão infectados, já que anticorpos IgG2 e IgG3 específicos para *T. gondii* são sintetizados pelos recém-nascidos, e a presença destes indicam uma resposta frente à infecção (BUFFOLANO *et al.*, 2005; PETERSEN, 2007; CAÑEDO-SOLARES *et al.*, 2008).

Para IgG2, a sensibilidade variou entre 13% (para rSAG1) e 95% (para rMIC3), enquanto a especificidade oscilou entre 27% (para rMIC3) e 73% (para rSAG1). Diferença estatística entre a proporção de crianças infectadas e não-infectadas reativas pelo teste de ELISA foi encontrada apenas utilizando os antígenos STAg e rMIC3.

Para IgG3, este comportamento também foi observado, porém com especificidades mais altas, variando entre 85% (para STAg) e 100% (para rMIC3), e sensibilidades moderadas variando entre 44% (para rMIC3) e 46% (para STAg).

Para IgG4, dependendo do antígeno utilizado, a sensibilidade variou entre 16% e 62%, enquanto a especificidade apresentou valores acima de 76%. Ao ser utilizado o antígeno recombinante rMIC3 foi observada diferença significativa entre a proporção de

crianças infectadas e não-infectadas. Apenas cerca de 5% das crianças não-infectadas reagiram ao antígeno, enquanto 62% daquelas infectadas foram reativas.

Segundo BUFFOLANO *et al.* (2005), essas diferenças significantes podem indicar que o plasma de crianças infectadas reconhecem um repertório mais complexo de antígenos do que o plasma das mães. Afirmam ainda, que rMIC3 reage com maior frequência com anticorpos IgG em crianças com toxoplasmose congênita, apesar de aquelas não infectadas apresentarem anticorpos maternos. Isto sugere que os anticorpos anti-MIC3 indicam a ocorrência de replicação ativa do parasito nos indivíduos infectados (BEGHETTO *et al.*, 2005; BUFFOLANO *et al.*, 2005).

De uma forma geral, todas as crianças reagiram com algum antígeno recombinante, fato este também observado por BUFFOLANO *et al.* (2005), o que demonstra a imunogenicidade destes antígenos. Em relação às subclasses, 98% das amostras testadas para IgG1 reagiram com algum antígeno recombinante, seguido de 61% para IgG4, 48% para IgG2 e 41% para IgG3.

Estudos demonstram que a combinação de antígenos recombinantes aumenta a sensibilidade do teste (AUBERT *et al.*, 2000; BEGHETTO *et al.*, 2006; HOLEC-GASIOR & KUR, 2010). Através dos achados descritos no presente trabalho, pode-se sugerir que a pesquisa de subclasses de IgG em recém-nascidos suspeitos de toxoplasmose congênita, utilizando uma combinação de antígenos recombinantes, poderia ser uma importante ferramenta complementar no diagnóstico da infecção, sendo capazes de detectar grande parte de crianças infectadas com *T. gondii*.

Ao testar amostras de pacientes adultos infectados, utilizando STAg, HUSKINSON *et al.* (1989), observaram que a infecção com *T. gondii* provoca uma resposta predominante de anticorpos IgG1. Uma resposta menor é observada para as subclasses IgG2 e IgG3, enquanto IgG4 pode não ser reconhecida. No presente trabalho,

este comportamento também foi observado, ao se utilizar STAg, rSAG1 e rMIC3, exceto para IgG4, a qual foi detectada em níveis consideráveis nos testes com rMIC3. Ainda, uma combinação dos antígenos recombinantes utilizados neste trabalho, poderia aumentar a resposta de IgG4, sendo a segunda subclasse mais predominante.

## **7.2 Análise comparativa de mães e respectivos filhos**

Uma análise comparativa do ELISA anti-STAg em crianças suspeitas de toxoplasmose congênita e de suas respectivas mães foi realizada, observando evidência de associação entre a infecção por *T. gondii* e o resultado da sorologia ao se pesquisar IgG2, IgG3 e IgG4. Estes resultados indicam que crianças positivas para essas subclasses, têm maiores chances de apresentar toxoplasmose congênita e de produzir uma resposta frente à infecção por *T. gondii*. Corroborando nossos resultados, CORREA *et al.* (2008) relatam que anticorpos IgG1 provavelmente são provenientes de transferência passiva. De fato, no presente estudo, não houve diferença significativa entre mães e recém-nascidos ao se analisar IgG total e IgG1. Assim, não se pode afirmar que anticorpos presentes nas crianças são resultado da infecção congênita. Já para as demais subclasses houve menor chance de haver transferência de anticorpos maternos para as crianças, devido à maior probabilidade de se encontrar estes anticorpos em crianças não-infectadas, mas com mães infectadas, sendo essa diferença significativa estatisticamente. Estes dados reforçam a idéia de produção de IgG2, IgG3 e IgG4 pelos recém-nascidos após infecção por *T. gondii*.

Os valores médios de IR encontrados no presente trabalho também concordam com o exposto acima, sendo que os maiores níveis médios de anticorpos encontrados foram para IgG1, provavelmente provenientes da mãe. Além disso, comparando-se os

valores médios de IR para subclasses de IgG entre mães e seus respectivos recém-nascidos ao utilizar STAg, observou-se diferença estatística significativa para todas as subclasses, exceto para IgG2. Ainda, comparando-se crianças com toxoplasmose congênita confirmada e suas mães, essa diferença foi mantida, com maiores médias de IR observadas nas mães, exceto para IgG2. Estes dados, em conjunto com a associação entre sorologia de mães de recém-nascidos, sugerem que, apesar de haver intensa produção de anticorpos maternos durante a gestação para controlar a infecção, o feto também pode ser capaz de montar uma resposta humoral contra o parasito.

Porém, estudos posteriores precisam ser realizados para observar se essas diferenças em ELISA utilizando STAg apresentam comportamento semelhantes em testes utilizando proteínas recombinantes.

### **7.3 Associação de anticorpos IgG e morbidade**

#### **7.3.1 Associação de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e lesão ocular**

Segundo LU *et al.* (2004), o olho é um local imunologicamente privilegiado, sendo que a patogenia da toxoplasmose ocular ainda é pouco entendida. Vários fatores podem estar envolvidos com as lesões oculares encontradas em indivíduos infectados com *T. gondii*. Entre eles, a lise de células da retina induzida pelo parasita ou por toxinas solúveis liberadas por este, reações de hipersensibilidade, mecanismos auto-imunes e danos provocados pela própria resposta imunológica (WHITTLE *et al.*, 1998; NOROSE *et al.*, 2003; CHARLES *et al.*, 2010). Além disso, sabe-se também, que a gravidade das lesões oculares está associada ao período da gestação em que a mãe se infecta (PINARD *et al.*, 2003).

Linfócitos B têm grande importância no controle da infecção (JOHNSON & SAYLES, 2002), sendo que anticorpos IgG são a principal classe envolvida na resposta humoral frente ao *T. gondii* (LU *et al.*, 2004). Entre todos os testes realizados para pesquisa de IgG total, apenas ao empregar rMIC3 como antígeno, foi possível diferenciar estatisticamente a proporção de crianças com lesões oculares ativas e cicatrizadas e aquelas sem lesões, apesar dos valores médios de IR entre os grupos não terem diferenças significativas. Segundo ISMAEL *et al.*, 2003, a proteína MIC3 confere proteção altamente eficaz contra a fase crônica da infecção em camundongos imunizados. Porém, sugerem que anticorpos anti-MIC3 não inibem a invasão celular por *T. gondii* (ISMAEL *et al.*, 2009). Poderia se especular, no presente trabalho, que estas observações talvez explicariam a associação entre a presença de IgG total e a ausência de lesão ocular (indicando proteção contra a infecção), com maiores níveis de IgG em crianças sem lesões, apesar de não haver diferença nos níveis médios de anticorpos de crianças com e sem lesões oculares.

De acordo com vários autores, IgG1 é produzido em ambiente Th1 durante os momentos iniciais da infecção, sendo que com a persistência da infecção esta subclasse, induzida por IL-10 e TGF- $\beta$ , pode regular positivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo com a atividade de células efectoras (HUSKINSON *et al.*, 1989; ABBAS & LICHTMAN, 2005; LU *et al.*, 2004; CAÑEDO-SOLARES *et al.*, 2008). Porém, a falta de atividade imunorreguladora da resposta Th1, faz aumentar a reação inflamatória no olho devido à atividade opsonizante e fixadora de complemento, com produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$ , levando à lesão da retina (GEIGER *et al.*, 1994; LU *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2006). Através dos exames clínicos oftalmológicos previamente realizados nos recém-nascidos, observou-se esta reação inflamatória inicial intensa na retina, a qual evoluiu, em alguns casos, para uma lesão destrutiva

caracterizada pela cicatrização. Segundo GAZZINELLI *et al.*(1994), a observação de múltiplas lesões desse tipo encontradas em conjunto com lesões ativas, não são comuns em indivíduos imunocompetentes.

A análise das proporções de testes positivos para IgG1 utilizando STAg, rSAG1 e rMIC3 como antígenos no presente trabalho não foram capazes de diferenciar crianças com algum tipo de lesão ocular e aquelas sem lesões. Estes dados poderiam ser explicados pelo fato de que, tanto na fase inicial como na fase crônica da infecção, esta subclasse de IgG não teria a capacidade de reconhecer tais antígenos em indivíduos infectados. Apesar de ser a primeira subclasse a responder frente à infecção, anticorpos IgG1 ainda são identificados numa fase crônica recente da infecção, na qual apesar de haver um controle da mesma, ainda representa uma resposta imunológica ativa (HUSKINSON *et al.*, 1989). Ressalta-se ainda, a possibilidade de IgG1 atravessar a placenta, e com isto, anticorpos das mães destas crianças (que são pacientes em fase crônica recente) serem identificados no plasma dos recém-nascidos.

Porém, apesar de não haver associação entre os antígenos utilizados nos testes para IgG1 e as lesões encontradas nas crianças, observou-se que os níveis médios de IR foram diferentes entre os grupos, dependendo do antígeno utilizado. Enquanto o IR dos ELISAs empregando rSAG1 foi menor em crianças com LAC ao serem comparadas àquelas com LA ou LC, ao se utilizar rMIC3 observou-se que crianças sem lesões apresentavam menores valores médios de IR quando comparadas com crianças com algum tipo de lesão ocular. Esse comportamento, apesar de não associar o tipo de lesão com alguma subclasse de IgG, indica que dependendo do antígeno utilizado no teste, a detecção de uma determinada subclasse pode ser distinta em pacientes com diferentes manifestações oculares.

As proteínas do micronema têm a capacidade de induzir uma resposta específica de células T helper frente à invasão do parasito tanto em pacientes com infecção adquirida como naqueles com infecção congênita, sendo um importante estimulador da resposta humoral do hospedeiro (BEGHETTO *et al.*, 2003; BEGHETTO *et al.*, 2005). BUFFOLANO *et al.* (2005) relatam que anticorpos produzidos contra a proteína MIC3 podem indicar replicação ativa de *T. gondii*, sendo que em indivíduos com infecção latente, estes anticorpos desaparecem. Os testes aqui realizados utilizando rMIC3 estiveram de acordo com o que foi relatado nesses estudos, já que foram observados maiores valores médios de IR em crianças com lesões oculares, quando comparadas com crianças sem lesões oculares. Anticorpos IgG reativos a rMIC3 podem ser indicativos de resposta específica linfoproliferativa, caracterizada pela manutenção da lesão ativa.

Já a proteína SAG1, apesar de ativar linfócitos T CD4+ e estimular uma forte resposta de anticorpos, não é capaz de induzir a proliferação de PBMC em indivíduos infectados (BEGHETTO *et al.*, 2005). Anticorpos anti-SAG1 podem ser detectados tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção (PRIGIONE *et al.*, 2000), sendo considerados anticorpos protetores. Porém, no presente trabalho não foi observada diferença entre as médias de IR de crianças sem lesões e aquelas com lesões oculares.

Os testes para IgG1 utilizando STAg apresentaram comportamento semelhante aquele observado para rSAG1, sendo que estes antígenos ativam células T de modo semelhante no organismo infectado, demonstrando que a proteína SAG1 é a principal determinante na resposta contra a infecção (FATOOHI *et al.*, 2002). Apesar disso, as médias de IR para IgG1 não foram estatisticamente diferentes entre o grupo de crianças sem lesões oculares e os grupos de crianças com lesões.



Os resultados da sorologia para IgG2 apresentaram associações muito significativas com as lesões oculares encontradas nos recém-nascidos ao ser utilizado o antígeno rMIC3. Além disso, as médias de IR de IgG2 foram maiores nas crianças com lesões oculares, indicando que esta subclasse está associada à morbidade da infecção.

Anticorpos IgG2 apresentaram alta reatividade a rMIC3, devido à capacidade desta proteína desencadear uma maior resposta humoral (BEGHETTO *et al.*, 2003; BEGHETTO *et al.*, 2005). A produção de IgG2 em recém-nascidos é estimulada de maneira diferente daquela que ocorre em indivíduos adultos (KAWANO & NOMA, 1996). Se num primeiro momento a produção de IFN- $\gamma$  está relacionada com o estímulo de células efectoras na resposta contra a infecção, a persistência desse estímulo, além de desencadear efeitos patogênicos, induz a produção de IgG2 (CAÑEDO-SOLARES *et al.*, 2008). Em recém-nascidos citocinas pró-inflamatórias podem aumentar a produção de IgG2, sendo no início da infecção estimulada por IFN- $\gamma$  e numa fase tardia por IL-2 (KAWANO & NOMA, 1996). As crianças incluídas neste estudo apresentaram este comportamento, as quais apresentaram lesões oculares indicativas tanto de infecções recentes como cicatrizadas e com maiores valores médios de IR para IgG2 anti-rMIC3 (características de uma resposta inflamatória contra a infecção), enquanto aquelas sem lesões oculares apresentaram menores médias de IR para IgG2. Estas observações também foram descritas por CAÑEDO-SOLARES *et al.* (2008), apesar destes autores não conseguirem associar a presença de anticorpos IgG2 com o prognóstico da infecção.

Anticorpos IgG3 reativos aos antígenos testados não apresentaram associação com as manifestações clínicas da infecção. Porém, os valores médios de IR para IgG3 foram diferentes dependendo do antígeno utilizado. O padrão de comportamento desta subclasse está mais relacionada à IgG1, sendo ativadores da via clássica do complemento, a qual age na eliminação do parasito. Os resultados aqui encontrados

estão parcialmente de acordo com CAÑEDO-SOLARES *et al.* (2008), já que estes autores relacionam a presença desta subclasse com sinais clínicos. No entanto, no que se refere a lesões oculares, não se pode estabelecer uma relação entre a presença de IgG3 e as lesões descritas nos recém-nascidos.

Ao medir a resposta de IgG4 para rMIC3 nos recém-nascidos observou-se associação da sorologia positiva com todos os tipos de lesões encontradas. Ainda, as médias de IR foram maiores nas crianças com lesões oculares, podendo indicar que estes anticorpos não foram protetores contra a infecção, fato este também observado por CAÑEDO-SOLARES *et al.* (2008). Esta subclasse está ligada ao perfil de citocinas Th2, o qual é capaz de bloquear as funções protetoras do organismo infectado, como impedimento da ativação das vias do complemento (VAN DER ZEE *et al.*, 1986; CORREA *et al.*, 2007; CAÑEDO-SOLARES *et al.*, 2008). VAN DER ZEE *et al.* (1986) ainda relatam que níveis significantes de IgG4 podem ser encontrados após estimulação antigênica prolongada. No presente trabalho, este dado pode ser observado pela sorologia positiva em crianças com lesões cicatrizadas, e naquelas com lesões ativas e cicatrizadas, características de exposição mais antiga ao parasito.

### **7.3.2 Associação de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e déficit auditivo**

O déficit auditivo é um sinal clínico pouco estudado nos casos de toxoplasmose congênita, os quais quase sempre são identificados em levantamentos epidemiológicos (ANDRADE *et al.*, 2008; RESENDE *et al.*, 2010). Os testes realizados no presente trabalho utilizando diferentes antígenos pesquisaram anticorpos IgG e suas subclasses, as quais foram associadas com a avaliação clínica auditiva das crianças estudadas.

Associações entre manifestações auditivas e o resultado do teste de ELISA foram encontradas quando se pesquisou anticorpos IgG1, utilizando rSAG1 como

antígeno. Porém, analisando o intervalo de confiança (IC95%), foi observado que o valor “p” não tem significado estatístico, devido talvez ao baixo número de crianças com comprometimento auditivo utilizadas no presente trabalho.

### **7.3.3 Associação de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e alterações neurológicas**

Alteração neurológica é uma das conseqüências mais graves da toxoplasmose, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (BHOPALE, 2003). Em recém nascidos, tais alterações são sinais sugestivos de toxoplasmose congênita (JONES *et al.*, 2001; HERMES *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2010). Segundo BHOPALE (2003), as alterações neurológicas da toxoplasmose pode ser causada pela recrudescência de uma infecção latente devido à uma disfunção ou supressão do sistema imune.

No presente trabalho, observou-se que os resultados da sorologia estão fortemente associados às lesões cerebrais quando foi utilizado o antígeno rMIC3 para pesquisa de anticorpos IgG2 e IgG4. Essas alterações neurológicas, sendo a maioria classificada previamente como calcificações cerebrais, encontradas nos recém-nascidos, são sugestivas de um processo inflamatório focal em processo de cura (HERMES *et al.*, 2008). Trabalhos relacionados à encefalite causada pela toxoplasmose demonstram que há intensa produção de IL-10 com o objetivo de se evitar lesões causadas pelo próprio sistema imune do indivíduo infectado (DECKERT-SCHÜTLER *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 2005). A presença de IL-6 (a qual favorece a produção de IgG2) no sistema nervoso, também impede a intensa resposta inflamatória, assim como o número de taquizoítos no cérebro de camundongos infectados com *T. gondii* (SUZUKI *et al.*, 1997; CORREA *et al.*, 2007).

A imunorregulação pode favorecer a produção de citocinas de perfil Th2, responsáveis pelo aumento na produção de IgG2 e IgG4. Estes anticorpos estão

relacionados a citocinas não-protetoras envolvidas na toxoplasmose (NGUYEN *et al.*, 1998; CAÑEDO-SOLARES *et al.*, 2008), sendo importantes na inibição da ativação das vias do complemento (VAN DER ZEE *et al.*, 1986). De fato, trabalhos envolvendo o papel da via clássica do complemento em alterações neurológicas, indicam que a presença de componentes dessa via estão correlacionados com patologias nervosas (STEVENS *et al.*, 2007; HERMES *et al.*, 2008).

De acordo com esses dados, o presente trabalho demonstra, através dos níveis médios para IgG2 e IgG4 anti-MIC3 maiores nas crianças com alterações neurológicas quando comparadas com aquelas sem alterações, que estas subclasses podem ser indicativas de uma infecção controlada, porém com maior probabilidade de se encontrar tais alterações no sistema nervoso devido à infecção por *T. gondii*.

No entanto, ao ser utilizado STAg como antígeno para o teste de ELISA, foi constatada associação apenas da subclasse IgG3 com o diagnóstico clínico da infecção. De forma contrária à rMIC3, os recém-nascidos com alterações neurológicas tiveram menor probabilidade de apresentar sorologia positiva para IgG3 anti-STAg, sendo que maiores valores médios de IR foram encontrados naqueles sem lesões. Diferente do que foi relatado por CAÑEDO-SOLARES *et al.* (2008), esta subclasse apresentou características imunoprotetoras, provavelmente devido à sua atividade fixadora de complemento, necessária para a lise do parasito (HUSKINSON *et al.*, 1989).

#### **7.3.4 Considerações Finais**

De um modo geral, pode-se observar que a resposta imunológica em recém-nascidos apresentam respostas distintas a diferentes antígenos de *T. gondii*. Os testes de ELISA utilizando diferentes antígenos para pesquisa de anticorpos IgG e suas subclasses apresentaram alta sensibilidade e baixa especificidade principalmente para

IgG total e IgG1, devido ao fato destas crianças apresentarem anticorpos maternos no sangue no momento da coleta das amostras (idade média de  $55,6 \pm 16,6$  dias). Porém, para as demais subclasses maiores índices de especificidade foram encontrados, demonstrando a importância da detecção de subclasses no diagnóstico da toxoplasmose congênita.

Um padrão de resposta frente à infecção foi observado, em que associações foram estabelecidas mais frequentemente entre os resultados da sorologia utilizando rMIC3 e as manifestações clínicas encontradas. Isso demonstra que essa proteína é bastante imunogênica, sendo que anticorpos anti-MIC3 podem estar associados às possíveis alterações encontradas em recém-nascidos com toxoplasmose congênita.

Além disso, os testes utilizando STAg não conseguiram, na maioria dos casos, apontar o envolvimento das subclasses estudadas com manifestações clínicas. Essa baixa associação talvez, se deva ao grande número de antígenos contidos em STAg, os quais não demonstram diretamente um comportamento específico de determinado anticorpo em manifestações clínicas específicas.

Comportamento semelhante foi observado ao utilizar rSAG1 nos testes sorológicos. Apesar de anticorpos para SAG1 serem produzidos tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção, no presente trabalho demonstrou-se que esta proteína, a qual é a mais prevalente na superfície de taquizoítos, não apresentou associações entre seus anticorpos reativos e a sintomatologia encontrada nas crianças com toxoplasmose congênita. Talvez, ao se tentar estabelecer uma associação com patologias ligadas ao sistema nervoso, anticorpos anti-SAG1 não sejam bons indicadores de alterações, principalmente devido à diferenças na estimulação da resposta imunológica em locais como o olho e o cérebro.

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram claramente que as subclasses de IgG anti-rMIC3 nos recém-nascidos apresentaram um perfil característico predominante de resposta do tipo 2, o qual prevalece em casos de toxoplasmose congênita. Além disso, a detecção destas subclasses, anti-rMIC3 foram capazes de diferenciar crianças com e sem manifestações clínicas.

Portanto, o uso de antígenos recombinantes associados à pesquisa de subclasses de IgG em testes sorológicos podem ser considerados importantes ferramentas auxiliares no diagnóstico neonatal da toxoplasmose congênita. Porém, o uso de outros antígenos para a pesquisa de subclasses de IgG devem ser testados.

## **8. CONCLUSÕES**

- IgG total e IgG1 anti-*T. gondii* apresentam alta sensibilidade e baixa especificidade para detectar proteínas totais (STAg) e recombinantes (rSAG1 e rMIC3) em recém-nascidos com toxoplasmose congênita.
- Os testes para detecção de anticorpos IgG2 utilizando STAg apresentaram sensibilidade e especificidade moderadas, enquanto que para rSAG1 observou-se baixa sensibilidade e alta especificidade e para rMIC3, alta sensibilidade e baixa especificidade.
- STAg, rSAG1 e rMIC3 apresentam alta especificidade e baixa sensibilidade para detectar anticorpos IgG3 e IgG4 anti-*T. gondii* em recém-nascidos com toxoplasmose congênita.
- IgG de crianças com toxoplasmose congênita apresentam alta reatividade para rMIC3 de *T. gondii*, principalmente anticorpos da subclasse IgG4.
- Diferença na proporção de recém-nascidos infectados com mães não infectadas comparadas com a proporção de recém-nascidos não-infectados com mães infectadas foi observada para as subclasses IgG2, IgG3 e IgG4, o que sugere produção destes anticorpos durante a gestação pelos recém-nascidos com toxoplasmose congênita.
- Recém-nascidos com toxoplasmose ocular apresentaram maiores níveis de IgG2 e IgG4 para rMIC3 quando comparados com crianças sem lesões oculares.
- A ocorrência e ausência de déficit auditivo em recém-nascidos com toxoplasmose congênita não esteve associada à presença de anticorpos IgG totais e subclasses nos testes utilizando STAg, rSAG1 e rMIC3.
- A ocorrência de alterações neurológicas em recém-nascidos com toxoplasmose congênita está associada a maior prevalência de IgG2 e IgG4 anti-rMIC3.



## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, A. K. & LICHTMAN, A. H., 2005. **Cellular and Molecular Immunology**. 5<sup>a</sup> ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 288p.

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMÈTRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDE, M. L., 2004. **Genetic Diversity, Clonality And Sexuality In *Toxoplasma gondii***. International Journal for Parasitology 34, 1185 – 1196.

ALTCHEH, J.; DIAZ, N. S.; PEPE, C. M.; MARTIN, V.; NIGRO, M.; FREILIJ, H.; ANGEL, S. O. 2006. **Kinetic Analysis of the Humoral Immune Response against 3 *Toxoplasma gondii*-Recombinant Proteins in Infants with Suspected Congenital Toxoplasmosis**. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 56, 161 – 165.

ANDRADE, G. M. Q.; RESENDE, L. M.; GOULART, E. M. A.; SIQUEIRA, A. L.; VITOR, R. W. A.; JANUÁRIO, J. N., 2008. **Hearing Loss In Congenital Toxoplasmosis Detected By Newborn Screening**. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology 74(1), 21 – 28.

ANDRIANARIVO, A. G.; BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; ROWE, J. D.; PACKHAM, A. E.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A., 2001. **Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum***. Parasitology Research 87, 817 – 825.

ASHBURN, D.; JOSS, A. W. L.; PENNINGTON, T. H.; HO-YEN, D. O. 1998. **Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy?** Journal of Clinical Pathology 51, 312 – 315.

AUBERT, D.; MAINE, G. T.; VILLENA, I.; HUNT, J. C.; HOWARD, L.; SHEU, M.; BROJANAC, S.; CHOVAN, L. E.; NOWLAN, S. F.; PINON, J. M., 2000. **Recombinant Antigens To Detect *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay.** Journal Of Clinical Microbiology 38(3), 1144 – 1150.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C. F.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D. G., 2003. **Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil.** Emerging Infectious Disease 9(1), 55 – 62.

BASSO, W.; MORE, G.; QUIROGA, M. A.; PARDINI, L.; BACIGALUPE, D.; VENTURINI, L.; VALENZUELA, M. C.; BALDUCCHI, D.; MAKSIMOV, P.; SCHARES, G.; VENTURINI, M. C., 2009. **Isolation And Molecular Characterization Of *Toxoplasma gondii* From Captive Slender-Tailed Meerkats (*Suricata suricatta*) With Fatal Toxoplasmosis In Argentina.** Veterinary Parasitology 161, 201 – 206.

BEGHETTO, E.; NIELSEN, H. V.; DEL PORTO, P.; BUFFOLANO, W.; GUGLIETTA, S.; FELICI, F.; PETERSEN, E.; GARGANO, N., 2005. **A Combination of Antigenic Regions of *Toxoplasma gondii* Microneme Proteins Induces Protective Immunity against Oral Infection with Parasite Cysts.** The Journal of Infectious Diseases 191, 637 – 645.

BEGHETTO, E.; SPADONI, A.; BRUNO, L.; BUFFOLANO, W.; GARGANO, N. 2006. **Chimeric Antigens of *Toxoplasma gondii*: Toward Standardization of**

**Toxoplasmosis Serodiagnosis Using Recombinant Products.** Journal Of Clinical Microbiology, 2133 – 2140.

BHOPALE, G. M., 2003. **Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status.** Microbes and Infection 5(5), 457 – 462.

BOBIĆ, B; SIBALIĆ, D; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O., 1991. **High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report.** Gynecologic and Obstetric Investigation 31(3), 182 – 184.

BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; da SILVA, E. M. K.; BORTOLIERO, A. L., 1997. **Surto de Toxoplasmose Aguda Transmitida através da Ingestão de Carne Crua de Gado Ovino.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 30(1), 21 – 25.

BUFFOLANO, W.; BEGHETTO, E.; DEL PEZZO, M.; SPADONI, A.; DI CRISTINA, M.; PETERSEN, E.; GARGANO, N., 2005. **Use Of Recombinant Antigens For Early Postnatal Diagnosis Of Congenital Toxoplasmosis.** Journal of Clinical Microbiology 43(12), 5916 – 5924.

CAÑEDO-SOLARES, I.; GALVÁN-RAMÍREZ, M. L.; LUNA-PASTÉN, H.; PÉREZ, L. R. R.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; RICO-TORRES, C. P.; VELA-AMIEVA, M.; PÉREZ-ANDRADE, M.; FIGUEROA-DAMIÁN, R.; CORREA, D., 2008. **Congenital**

**Toxoplasmosis Specific IgG Subclasses In Mother/Newborn Pairs.** The Pediatrics Infectious Disease Journal 27(5), 469 – 474.

CARELLOS, E. V. M.; ANDRADE, G. M. Q.; AGUIAR, R. A. L. P., 2008. **Avaliação Da Aplicação Do Protocolo De Triagem Pré-Natal Para Toxoplasmose Em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: Estudo Transversal Em Puérperas De Duas Maternidades.** Caderno de Saúde Pública 24(2), 391 – 401.

CARVALHO, F. R.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, T. C.; BÉLA, S. R.; FARIA, G. G.; LOPES, C. S.; MINEO, J. R., 2008. **Reverse Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies Against SAG1-Related Sequence, SAG2A, And P97 Antigens From *Toxoplasma gondii* To Detect Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, And IgA Antibodies In Human Sera.** Clinical and Vaccine Immunology 15(8), 1265 – 1271.

CHARLES, E.; CALLEGAN, M. C.; BLADER, I. J., 2007. **The SAG1 *Toxoplasma gondii* surface protein is not required for acute ocular toxoplasmosis in mice.** Infection and immunity 75(4), 2079 – 2083.

CHARLES, E.; JOSHI, S.; ASH, J. D.; FOX, B. A.; FARRIS, A. D.; BZIK, D. J.; LANG, M. L.; BLADER, I. J., 2010. **CD4 T-cell suppression by cells from *Toxoplasma gondii*-infected retinas is mediated by surface protein PD-L1.** Infection and immunity 78(8), 3484 – 3492.

CHIARI, C. A. & NEVES, D. P., 1984. **Toxoplasmose Humana Adquirida Através da Ingestão de Leite de Cabra.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 79(3), 337 – 340.

CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C. P. 2007. **Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host.** *Parasite Immunology* 29, 651 – 660.

DECKERT-SCHLÜTER, M.; BUCK, C.; WEINER, D.; KAEFER, N.; RANG, A.; HOF, H.; WIESTLER, O. D.; SCHLÜTER, D., 1997. **Interleukin-10 downregulates the intracerebral immune response in chronic *Toxoplasma* encephalitis.** *Journal of Neuroimmunology* 76, 167 – 176.

DE CRAEYE, S.; FRANCAERT, A.; CHABAUTY, J.; DE VRIENDT, V.; VAN GUCHT, S.; LEROUX, I.; JONGERT, E., 2008. **Prevalence Of *Toxoplasma gondii* Infection In Belgian House Cats.** *Veterinary Parasitology* 157, 128 – 132.

DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; SERRURIER, B.; DARDÉ, M. L.; CARME, B., 2008. **Case Report: Atypical *Toxoplasma gondii* Strain from a Free-living Jaguar (*Panthera onca*) in French Guiana.** *Tropical Medicine* 78(2), 195 – 197.

DEROUIN, F. & PELLOUX, H., 2008. **Prevention of Toxoplasmosis in Transplant Patients.** *Clinical Microbiology and Infection* 14(12), 1089 – 1101.

DORNY, P.; PRAET, N.; DECKERS, N.; GABRIEL, S., 2009. **Emerging Food-Borne Parasites.** *Veterinary Parasitology* 163, 196 – 206.

DUBEY, J. P., 1996. **Strategies To Reduce Transmission Of *Toxoplasma gondii* To Animals And Humans.** *Veterinary Parasitology* 64, 65 – 70.

DUBEY, J. P., 1998. **Re-examination of Resistance of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites and Bradyzoites to Pepsin and Trypsin Digestion.** *Parasitology* 116, 43 – 50.

DUBEY, J. P. 2004. **Toxoplasmosis – A Waterborne Zoonosis.** *Veterinary Parasitology* 126, 57 – 72.

DUBEY, J. P., 2008. **The History of *Toxoplasma gondii* - The First 100 Years.** *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55(6), 467 – 475.

DUBEY, J. P., 2009. **Toxoplasmosis in pigs—The last 20 years.** *Veterinary Parasitology* 164, 89 – 103.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S., 1996. **A review of *Neospora caninum* and neosporosis.** *Veterinary Parasitology* 67, 1 – 59.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L; FRENKEL, J. K., 1970. **The *Toxoplasma gondii* Oocyst From Cat Feces.** *Journal of Experimental Medicine* 132, 636 – 662.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A., 1998. **Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts.** *Clinical Microbiology Reviews* 11(2), 267 – 299.

DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J., 1988. **Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission.** *Journal of American Veterinary Medical Association* 193,1259 – 1263.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; NISHI, S. M.; SHENA, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P., 2002. **Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings.** *International Journal for Parasitology* 32, 99 – 105.

DUBEY, J. P. & SU, C., 2009. **Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(2), 190 – 195.

DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; PETERSEN, E.; PECKHAM, C.; GILBERT, R., 1999. **Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling.** *Lancet* 29, 1829 – 1833.



EL-NAWAWI, F. A.; TAWFIK, M. A.; SHAAPAN, R. M., 2008. **Methods for Inactivation of *Toxoplasma gondii* Cysts in Meat and Tissues of Experimentally Infected Sheep.** Foodborne Pathogens and Disease 5(5), 687 – 690.

ELSHEIKHA, H. M., 2008. **Congenital Toxoplasmosis: Priorities For Further Health Promotion Action.** Public Health 122, 335 – 353.

ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S. W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E. A., 1999. **Detection Of *T. gondii* In Tissues Of Sheep And Cattle Following Oral Infection.** Veterinary Parasitology 86, 155 – 171.

FERREIRA, A. M.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T.; MELO, M. N., 2006. **Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP.** Infection, Genetics and Evolution 6(1), 22 – 31.

FATOOHI, A. F.; COZON, G. J. N.; FERRANDIZ, J.; BIENVENU, J.; PICOT, S.; PEYRON, F., 2002. **Cellular Immune Responses to Recombinant Antigens in Pregnant Women Chronically Infected with *Toxoplasma gondii*.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 9(3), 704 – 707.

GAZZINELLI, R. T.; BRÉZIN, A.; LI, Q.; NUSSENBLAT, R. B.; CHAN, C., 1994. ***Toxoplasma gondii*: Acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ .** Experimental Parasitology 78, 217 – 229.

GEIGER, K.; HOWES, E.; GALLINA, M.; HUANG, X. J.; TRAVIS, G. H.; SARVETNICK, N., 1994. **Articles Transgenic Mice Expressing IFN-7 in the Retina Develop Inflammation of the Eye and Photoreceptor Loss.** Investigative Ophthalmology & Visual Science 35(6), 2667 – 2681.

GILBERT, R. E.; FREEMAN, K.; LAGO, E. G.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; TAN, H. K.; WALLON, M.; BUFFOLANO, W.; STANFORD, M. R.; PETERSEN, E., 2008. **Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe.** PLoS Neglected Tropical Diseases 2(8): e277.

GUGLIETTA, S.; BEGHETTO, E.; SPADONI, A.; BUFFOLANO, W.; DEL PORTO, P.; GARGANO, N., 2007. **Age-dependent impairment of functional helper T cell responses to immunodominant epitopes of *Toxoplasma gondii* antigens in congenitally infected individuals.** Microbes and Infection 9, 127 – 133.

HERMES, G.; AJIOKA, J. W.; KELLY, K. A.; MUI, E.; ROBERTS, F.; KASZA, K.; MAYR, T, *et al.*, 2008. **Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection.** Journal of Neuroinflammation 5(48), 1 – 37.

HIGA, L. T.; ARAÚJO, S. M.; TSUNETO, L.; CASTILHO-PELLOSO, M.; GARCIA, J. L.; SANTANA, R. G.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L., 2010. **A prospective study of Toxoplasma-positive pregnant women in southern Brazil: a health alert.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 104, 400 – 405.

HILL, D.; DUBEY, J. P., 2002. ***Toxoplasma gondii*: Transmission, Diagnosis And Prevention.** *Clinical Microbiology & Infection* 8(10), 634 – 640.

HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E.; BRILLOWSKA-DAZBROWSKA, A., DAZBROWSKI, S.; PIETKIEWICZ, H.; MYJAK, P.; KUR, J., 2003. **High Yield Expression And Single-Step Purification Of *Toxoplasma gondii* SAG1, GRA1, And GRA7 Antigens In *Escherichia coli*.** *Protein Expression and Purification* 27, 150 – 157.

HOLEC-GAŚIOR, L. & KUR, J., 2010. ***Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay.** *Experimental Parasitology* 124(3), 272 – 278.

HUSKINSSON, J.; STEPICK-BIEK, P. N.; ARAUJO, F. G.; THULLIEZ, P.; SUZUKI, Y.; REMINGTON, J. S., 1989. ***Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection.** *Journal of Clinical Microbiology* 27(9), 2031 – 2038.

ISMAEL, A. B.; SEKKAI, D.; COLLIN, C.; BOUT, D.; MÉVÉLEC, M. N., 2003. **The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis.** *Infection and Immunity* 71(11), 6222 – 6228.

ISMAEL, A. B. ; HEDHLI, D. ; CÉRÈDE, O. ; LEBRUN, M. ; DIMIER-POISSON, I. ; MÉVÉLEC, M., 2009. **Further analysis of protection induced by the MIC3 DNA**

**vaccine against *T. gondii*: CD4 and CD8 T cells are the major effectors of the MIC3 DNA vaccine-induced protection, both Lectin-like and EGF-like domains of MIC3 conferred protection.** Vaccine 27(22), 2959 – 2966.

JACOBS, D.; VERCAMMEN, M.; SAMAN, E., 1999. **Evaluation of Recombinant Dense Granule Antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for Detection of Immunoglobulin G Antibodies and Analysis of a Major Antigenic Domain.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 6(1), 24 – 29.

JIANG, T.; GONG, D.; MA, L. A.; NIE, H.; ZHOU, Y.; YAO, B.; ZHAO, J., 2008. **Evaluation of a recombinant MIC3 based latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in swines.** Veterinary Parasitology 158, 51 – 56.

JOHNSON, L. L. & SAYLES, P. C., 2002. **Deficient Humoral Responses Underlie Susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-Deficient Mice.** Infection and immunity 70(1), 185 – 191.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R., 2001. **Congenital Toxoplasmosis: A Review.** Obstetrical and Gynecological Survey 56(5), 296 – 305.

JONES, L. A.; ALEXANDER, J.; ROBERTS, C.W., 2006. **Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye.** Parasite immunology 28(12), 635 – 642.

JONES, J. L. & DUBEY, J. P., 2010. **Waterborne Toxoplasmosis – Recent Developments.** Experimental Parasitology 124, 10 – 25.

JONGERT, E.; VERHELST, D.; ABADY, M.; PETERSEN, E.; GARGANO, N., 2008. **Protective Th1 immune responses against chronic toxoplasmosis induced by a protein–protein vaccine combination but not by its DNA–protein counterpart.** Vaccine 26, 5289 – 5295.

KAHI, S.; COZON, G. J. N.; PINON, J. M.; GREENLAND, T.; WALLON, M.; AL KURDI, M.; FERRANDIZ, J.; PEYRON, F., 1999. **A Switch Towards Th2 During Serological Rebound In Children With Congenital Toxoplasmosis.** Clinical and Experimental Immunology 117, 524 – 528.

KAWANO, Y. & NOMA, T., 1996. **Role of interleukin-2 and interferon-gamma in inducing production of IgG subclasses in lymphocytes of human newborns.** Immunology 88(1), 40 – 48.

KHAN, A.; SU, C.; GERMAN, M.; STORCH, G. A.; CLIFFORD, D. B.; SIBLEY, L. D., 2005. **Genotyping of *Toxoplasma gondii* Strains from Immunocompromised Patients Reveals High Prevalence of Type I Strains.** Journal of Clinical Microbiology 43(12), 5881 – 5887.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V.; BELFORT, J. R. R.; VITOR, R. W. A.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L. D., 2006. **Genetic Divergence of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Ocular Toxoplasmosis, Brazil.** Emerging Infectious Disease 12(6), 942 – 949.

KNOTTNERUS, J. A., 2002. **The Evidence Base Of Clinical Diagnosis.** 1 ed.,  
Londres: BMJ Books, 226p.

LAPPALAINEN, M. & HEDMAN, K., 2004. **Serodiagnosis Of Toxoplasmosis. The Impact Of Measurement Of IgG Avidity.** *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 40(1), 81 – 88.

LEBECH, M.; ANDERSEN, O.; CHRISTENSEN, N. C.; HERTEL, J.; NIELSEN, H. E.; PEITERSEN, B.; RECHNITZER, C.; LARSEN, S. O.; NØRGAARD-PEDERSEN, B.; PETERSEN, E. 1999. **Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment.** *Lancet* 353, 1834 –1837.

LI, S.; GALVAN, G.; ARAUJO, F. G; SUZUKI, Y.; REMINGTON, J. S; PARMLEY, S. 2000. **Serodiagnosis of Recently Acquired *Toxoplasma gondii* Infection Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Combination of Recombinant Antigens.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7(5), 781 – 787.

LIU, Q.; GAO, S.; JIANG, L.; SHANG, L.; MEN, J.; WANG, Z.; ZHAI, Y.; XIA, Z.; HU, R.; ZHANG, X.; ZHU, X. Q., 2008. **A recombinant pseudorabies virus expressing TgSAG1 protects against challenge with the virulent *Toxoplasma gondii* RH strain and pseudorabies in BALB/c mice.** *Microbes and Infection* 10, 1355 – 1362.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J., 1951. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *Journal of Biology Chemistry* 193, 265 – 275.

LU, F.; HUANG, S.; KASPER, L. H., 2003. **Interleukin-10 and Pathogenesis of Murine Ocular Toxoplasmosis.** *Infection and immunity* 71(12), 7159 – 7163.

LU, F.; HUANG, S.; KASPER, L. H., 2004. **CD4+ T Cells in the Pathogenesis of Murine Ocular Toxoplasmosis.** *Infection and immunity* 72(9), 4966 – 4972.

LÜDER, C. G. K; BOHNE, W.; SOLDATI, D., 2001. **Toxoplasmosis: A Persisting Challenge.** *Trends in Parasitology* 17(10), 460 – 463.

LUKEŠOVÁ, D. & LITERÁK, I., 1998. **Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic.** *Veterinary Parasitology* 74, 1 – 7.

MACHADO, A. S.; ANDRADE, G. M. Q.; JANUÁRIO, J. N.; FERNANDES, M. D.; CARNEIRO, A. C. A. V.; CARNEIRO, M.; CARELLOS, E. V. M.; ROMANELLI, R. M. C.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; VÍTOR, R. W. A., 2010. **IgG and IgM Western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 757 – 761.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; MADIGAN, J.; LAKRITZ, J.; NORDLHAUSEN, R.; CONRAD, P. A., 1996. **Neosporosis as a cause of equine Protozoal Myeloencephalitis,** *Journal of American Veterinary Medicine Association* 209, 1907 – 1913.

MEIRELES, L. R.; GALISTEO JR, A. J.; POMPEU, E.; ANDRADE JR, H. F., 2004.

***Toxoplasma gondii* Spreading In An Urban Area Evaluated By Seroprevalence In Free-Living Cats And Dogs.** Tropical Medicine and International Health 9(8), 876 – 881.

MIORANZA, S. L.; MEIRELES, L. R.; MIORANZA, E. L.; ANDRADE Jr., H. F., 2008. **Evidência sorológica da infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* em gestantes de Cascavel, Paraná.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41(6), 628 – 634.

MIRÓ, G.; MONTOYA, A.; JIMÉNEZ, S.; FRISUELOS, C.; MATEO, M.; FUENTES, I., 2004. **Prevalence Of Antibodies To *Toxoplasma gondii* And Intestinal Parasites In Stray, Farm And Household Cats In Spain.** Veterinary Parasitology 126, 249 – 255.

MONTOYA, J. G. & LIESENFELD, O. 2004. **Toxoplasmosis.** Lancet 363, 1965 – 1976.

MONTOYA, J. G. & ROSSO, F., 2005. **Diagnosis and Management of Toxoplasmosis.** Clinics in Perinatology 32, 705 – 726.

MORAIS, C. G.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H.; FONTES, C. J. F.; KRETTLI, A. U.; BRAGA, E. M., 2006. **Antibodies To *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1: Persistence And Correlation With Malaria Transmission Intensity.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 75(4), 582 – 587.



MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; WADA, M.; JONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R. M.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O., 2006. **Waterborne Toxoplasmosis Brazil, from Field to Gene.** Emerging Infectious Diseases 12, 326 – 329.

NGUYEN, T. D.; BIGAIGNON, G.; VAN BROECK, J.; VERCAMMEN, M.; NGUYEN, T. N.; DELMEE, M.; TURNEER, M.; WOLF, S. F.; COUTELIER, J. P., 1998. **Acute and chronic phases of *Toxoplasma gondii* infection in mice modulate the host immune responses.** Infection and Immunity 66(6), 2991 – 2995.

NICOLLE, C. & MANCEUAX, L., 1909. **Sur un protozoaire nouveau du gondi.** C R Hebd Séances Acad Sci 148, 369 – 372.

NOROSE, K., MUN, H.; AOSAI, F.; CHEN, M.; PIAO, L.; KOBAYASHI, M.; IWAKURA, Y.; YANO, A., 2003. **IFN- $\gamma$ -Regulated *Toxoplasma gondii* Distribution and Load in the Murine Eye.** Investigative Ophthalmology & Visual Science 44(10), 4375 – 4381.

PETERSEN, E. 2007. **Toxoplasmosis.** Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 12, 214 – 223.

PIETKIEWICZ, H.; HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E.; KUR, J.; PETERSEN, E.; NIELSEN, H. V.; STANKIEWICZ, M.; ANDRZEJEWSKA, I.; MYJAK, P., 2004.

**Usefulness of *Toxoplasma gondii*-Specific Recombinant Antigens in Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis.** Journal of Clinical Microbiology 42(4), 1779 – 1781.

PINARD, J. A.; LESLIE, N. S.; IRVINE, P. J., 2003. **Maternal Serologic Screening for Toxoplasmosis.** Journal of Midwifery & Women's Health 48(5), 308 – 316.

PINON, J. M.; DUMON, H.; CHEMLA, C.; FRANCK, J.; PETERSEN, E.; LEBECH, M.; ZUFFEREY, J.; BESSIERES, M. H.; MARTY, P.; HOLLIMAN, R.; JOHNSON, J.; LUYASU, V.; LECOLIER, B.; GUY, E.; JOYNSON, D. H. M.; DECOSTER, A.; ENDERS, G.; PELLOUX, H.; CANDOLFI, E., 2001. **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 39(6), 2267 – 2271.

PRIGIONE, I., FACCHETTI, P.; LECORDIER, L.; DESLÉE, D.; CHIESA, S.; CESBRON-DELAUW, M. F.; PISTOIA, V., 2000. **T Cell Clones Raised from Chronically Infected Healthy Humans by Stimulation with *Toxoplasma gondii* Excretory-Secretory Antigens Cross-React with Live Tachyzoites: Characterization of the Fine Antigenic Specificity of the Clones and Implications for Vaccine Development.** The Journal of Immunology 164, 3741 – 3748.

RAJASEKARIAH, G. H. R.; RYAN, J. R.; HILLER, R. S.; YI, L. P.; STITELER, J. M.; CUI, L.; SMITHYAMAM, A. M.; MARTIN, S. K., 2001. **Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens.** Journal of Immunological Methods 252, 105 – 119.

RAMOS SILVA, J. C.; OGASSAWARA, S.; ADANIA, C. H.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; FERREIRA-NETO, J. S., 2001. **Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil.** Veterinary Parasitology 102, 217 – 224.

RESENDE, L. M.; ANDRADE, G. M. Q.; AZEVEDO, M. F.; PERISSINOTO, J.; VIEIRA, A. B. Q., 2010. **Congenital toxoplasmosis : Auditory and language outcomes in early diagnosed and treated children.** Scientia Medica 20(1), 13 – 19.

RILLING, V.; DIETZ, K.; KRCZAL, D.; KNOTEK, F.; ENDERS, G., 2003. **Evaluation of a Commercial IgG/IgM Western Blot Assay for Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis.** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 22, 174 – 180.

ROC, M. L.; PALACIÁN, M. P.; LOMBA, E.; MONFORTE, M. L.; REBAJE, V.; PINILLA, M. J. R. 2010. **Diagnóstico serológico de los casos de toxoplasmosis congénita.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 28(8), 517 – 519.

RORMAN, E; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I; BEN-DAVID, H. 2006. **Congenital toxoplasmosis—prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection.** Reproductive Toxicology 21, 458 – 472.

SAEIJ, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C., 2005. **Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host.** Trends in Parasitology 21(10), 476 – 481.

SENSINI, A., 2006. ***Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis.** Clinical Microbiology and Infection 12, 504 – 512.

SIMISTER, N., 2003. **Placental transport of immunoglobulin G.** Vaccine 21(24), 3365 – 3369.

SPALDING, S. M.; AMENDOEIRA, M. R. R.; KLEIN, C. H.; RIBEIRO, L. C., 2005. **Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38 (2), 173 – 177.

SPLENDRE, A. 1908. **Un nuovo protozoa parassita dei conigli incontrato nelle lesione anatomiche d'une malattia Che ricorda in molti punti Il Kala-azar cell'uoma. Nota preliminare.** Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo 3. 109 – 112.

STEVENS, B.; ALLEN, N. J. VAZQUEZ, L. E.; HOWELL, G. R.; CHRISTOPHERSON, K. S., NOURI, N.; MICHEVA, K. D., *et al.*, 2007. **The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination.** Cell 131(6), 1164 – 1178.

SUKTHANA, Y., 2006. **Toxoplasmosis: beyond animals to humans.** Trends in Parasitology 22(3), 137 – 142.

SUZUKI, Y., RANI, S.; LIESENFELD, O.; KOJIMA, T.; LIM, S.; NGUYEN, T. A.; DALRYMPLE, S. A.; MURRAY, R.; REMINGTON, J. S., 1997. **Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice.** Infection and Immunity 65(6), 2339 – 2345.

TANGTEERAWATANA, P.; PERLMANN, H.; HAYANO, M.; KALAMBAHETI, T.; TROYE-BLOMBERG, M.; KHUSMITH, S., 2009. **IL4 gene polymorphism and previous malaria experiences manipulate anti-*Plasmodium falciparum* antibody isotype profiles in complicated and uncomplicated malaria.** Malaria Journal 8, 286 - 296.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. 2000. ***Toxoplasma gondii*: from animals to humans.** International Journal for Parasitology 30, 1217 – 1258.

VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; MACHADO, D. O.; CAMPOS, W. R. ; ORÉFICE, F.; ANDRADE, G. M. Q ; CARELLOS, E. V. M. ; ROMANELLI, R. M.; JANUARIO, J. N.; RESENDE, L. M.; MARTINS FILHO, O.; CARNEIRO, A. C. A. V.; VITOR, R. W. A.; CAIAFFA, W. T. 2009. **Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates.** Ophthalmology 116, 2199 – 2205.

VAN DER ZEE, J. S.; VAN SWIETEN, P.; AALBERSE, R. C., 1986. **Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies.** *Clinical and Experimental Immunology* 64, 415 – 422.

WHITTLE, R. M.; WALLACE, G. R.; WHISTON, R. A.; DUMONDE, D. C.; STANFORD, M. R., 1998. **Human antiretinal antibodies in *Toxoplasma retinochoroiditis*.** *The British Journal of Ophthalmology* 82(9), 1017 – 1021.

WILSON, E. H.; WILLE-REECE, U.; DZIERSZINSKI, F.; HUNTER, C. A., 2005. **A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis.** *Journal of Neuroimmunology* 165, 63 – 74.

ZHOU, P.; ZHANG, H.; LIN, R. Q.; ZHANG, D. L.; SONG, H. Q.; SU, C.; ZHU, X. Q., 2009. **Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China.** *Parasitology International* 58, 193 – 195.

## ANEXOS

**Anexo-Tabela 1. Índice de reatividade (IR) do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG e suas subclasses anti-proteínas totais de *Toxoplasma gondii* em plasma de 217 crianças avaliadas neste estudo.**

<b>Código do recém-nascido</b>	<b>Padrão-ouro*</b>	<b>IgG Total</b>	<b>IgG1</b>	<b>IgG2</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG4</b>
1001	Sim	2,104908	8,202403	0,800679	0,511086	0,843244
1002	Não	3,215189	5,153722	0,95985	0,19784	0,380579
1003	Sim	3,384815	9,523498	1,008083	0,774873	0,582062
1004	Sim	4,698133	7,087306	0,318342	0,939739	1,093232
1005	Sim	2,364487	13,92415	0,805502	1,731099	1,201436
1006	Sim	3,037852	14,14754	1,427716	1,203526	1,186511
1007	Sim	4,695563	2,795661	1,123844	2,440025	1,179049
1008	Sim	3,78575	5,706398	0,168818	1,252986	0,858168
1009	Sim	1,711683	11,5211	0,578804	3,923823	0,914136
1010	Sim	NR†	9,294051	0,795855	0,362706	1,320833
1011	Sim	3,156076	3,939649	3,420199	1,121092	0,813394
1012	Sim	5,016825	8,874363	2,520677	0,362706	0,749965
1015	Sim	1,925001	8,596828	0,654503	0,461626	0,51117
1016	Não	3,667525	3,811035	2,507251	0,54406	0,999953
1017	Sim	4,310049	4,034417	1,419769	0,016487	0,51117
1018	Sim	4,428273	16,02259	0,65786	1,714612	1,007415
1019	Sim	1,416122	4,677487	0,654503	1,318932	0,220139
1020	Sim	2,829674	2,064593	1,990361	1,190524	0,375652
1021	Sim	4,672432	3,871957	1,490254	2,757797	0,478103
1022	Sim	1,934315	8,42083	0,37592	0,527448	1,459922
1023	Sim	3,071424	19,49797	0,543741	4,269813	0,443953
1024	Sim	2,98952	15,31385	1,416412	2,180116	0,230514
1025	Sim	1,437427	13,52305	1,087482	1,954067	0,145138
1026	Sim	2,64279	5,288719	0,688068	0,929312	2,902768

<b>1027</b>	Sim	3,072789	11,66531	1,413523	3,757436	NR†
<b>1028</b>	Não	2,878948	18,64441	1,717307	3,52134	1,195258
<b>1029</b>	Sim	1,567109	28,63607	3,478011	1,542156	1,237945
<b>1030</b>	Não	2,182759	3,464446	0,427777	0,10549	0,674467
<b>1031</b>	Sim	2,487171	7,765714	1,453821	1,064942	0,093913
<b>1032</b>	Sim	1,6579	17,22181	3,044035	0,261212	0,358577
<b>1033</b>	Sim	2,670091	10,76154	2,991338	3,697156	0,819605
<b>1034</b>	Sim	1,343236	5,489556	0,083695	1,230711	0,31589
<b>1036</b>	Sim	1,922029	7,882869	0,446376	2,12486	0,093913
<b>1037</b>	Não	3,004535	28,85364	1,599513	0,75852	1,972175
<b>1038</b>	Sim	3,015456	24,45196	1,720407	0,899172	1,263558
<b>1039</b>	Sim	1,32276	5,824286	0,409178	2,744394	0,949236
<b>1040</b>	Não	1,268157	0,970714	0,350281	0,950324	0,107461
<b>1041</b>	Não	2,652345	19,11303	3,592705	0,444077	0,119401
<b>1042</b>	Não	1,035921	1,346819	0,675763	0,559537	0,328352
<b>1043</b>	Não	2,816312	36,63899	0,275885	1,074666	1,39699
<b>1044</b>	Não	2,419262	45,37957	0,991946	0,683878	0,728345
<b>1045</b>	Sim	1,392844	13,82551	3,772495	1,989464	0,089551
<b>1046</b>	Sim	1,634665	6,9265	3,566575	1,998345	0,364172
<b>1047</b>	Sim	2,27776	7,393764	1,700344	3,561496	0,668645
<b>1048</b>	Sim	1,617769	7,091417	1,315249	3,401628	0,280592
<b>1049</b>	Não	1,298862	8,053431	0,740568	0,142105	0,113431
<b>1050</b>	Não	1,785671	8,273319	3,987218	0,639471	0,746255
<b>1051</b>	Não	2,188001	20,06486	3,359216	0,932561	0,991027
<b>1052</b>	Sim	2,146818	32,92836	0,485813	1,607558	1,385049
<b>1053</b>	Sim	1,118288	4,122917	0,740568	0,46184	0,107461
<b>1054</b>	Sim	1,745543	8,300806	3,987218	1,456572	2,549207
<b>1055</b>	Sim	2,228129	19,24028	3,359216	3,41051	1,755192



<b>1056</b>	Sim	2,071843	23,33571	0,485813	1,261178	0,453723
<b>1057</b>	Não	1,128848	2,693639	0,793889	0,421504	0,560019
<b>1058</b>	Não	1,768775	9,372764	0,314001	0,704431	0,713288
<b>1059</b>	Sim	1,468875	2,308833	2,618648	2,748437	0,100214
<b>1060</b>	Sim	2,765833	15,69879	0,497662	0,981585	1,137723
<b>1061</b>	Sim	2,94992	22,53003	0,604303	2,084424	0,901926
<b>1062</b>	Não	2,112474	24,25307	5,083258	0,727528	1,190778
<b>1063</b>	Não	2,382569	11,49563	2,618648	1,379993	0,365486
<b>1064</b>	Sim	2,510827	19,80624	1,551348	1,293382	1,096459
<b>1065</b>	Não	0,396843	5,134306	0,422915	0,490792	0,235798
<b>1066</b>	Sim	1,67489	24,10513	0,610658	3,412451	0,394961
<b>1067</b>	Sim	1,750336	9,050303	1,1561	3,025591	0,147373
<b>1068</b>	Sim	2,209045	15,87284	1,298389	0,369538	0,44212
<b>1069</b>	Não	3,14306	28,89135	1,335938	0,554307	0,701498
<b>1070</b>	Sim	1,247869	20,62425	0,300388	3,799311	0,165058
<b>1071</b>	Sim	1,895191	11,28677	1,501942	1,062421	0,076634
<b>1072</b>	Sim	2,264874	18,77068	1,38732	0,282927	0,53644
<b>1073</b>	Sim	2,362954	19,29281	1,331985	2,303837	0,583599
<b>1074</b>	Não	1,186003	18,32686	0,314222	0,80259	0,377276
<b>1075</b>	Sim	1,63415	13,29698	0,816187	2,607834	1,032483
<b>1076</b>	Sim	2,376534	11,88722	1,270722	1,430583	0,709123
<b>1077</b>	Sim	2,011377	6,99658	0,713422	5,029394	0,243938
<b>1078</b>	Sim	3,971091	18,15042	0,252959	0,976075	0,693995
<b>1079</b>	Sim	3,56427	28,54177	1,098789	0,797252	1,425809
<b>1080</b>	Sim	2,724971	44,3354	2,110624	1,587053	1,206454
<b>1081</b>	Sim	3,489136	NR†	NR†	NR†	NR†
<b>1082</b>	Sim	4,467707	11,61566	0,766781	4,261946	0,281758
<b>1083</b>	Sim	3,619245	26,2921	2,646923	0,491763	1,282094

<b>1084</b>	Sim	2,913722	17,82904	1,018047	1,832935	0,745052
<b>1086</b>	Sim	3,5716	7,759077	1,692504	7,860757	0,364962
<b>1087</b>	Sim	4,134186	25,28204	1,077434	0,171372	1,353951
<b>1088</b>	Não	3,958263	32,01576	2,078513	0,357646	1,879648
<b>1089</b>	Sim	2,103744	9,580241	0,262996	1,058036	0,325251
<b>1090</b>	Sim	3,892292	16,05379	1,700988	1,542348	0,226919
<b>1091</b>	Sim	4,159842	13,92655	0,869582	-0,05216	0,404673
<b>1092</b>	Não	4,19466	36,53041	1,650085	2,041562	1,533596
<b>1093</b>	Sim	2,924717	26,76652	0,453879	3,010186	0,909568
<b>1094</b>	Sim	4,332099	7,988635	1,141061	0,602564	1,3344
<b>1095</b>	Sim	4,546505	12,09008	2,642681	3,623107	3,980032
<b>1096</b>	Sim	3,492801	12,38085	0,530233	2,232575	0,7784
<b>1097</b>	Não	4,137885	7,543089	0,29693	0,038626	0,532833
<b>1098</b>	Não	10,4994	5,912839	1,056224	0,579388	0,9174
<b>1099</b>	Sim	10,12235	1,060299	1,480411	2,116698	0,8896
<b>1100</b>	Sim	5,15302	13,07384	1,043499	3,955289	1,566066
<b>1101</b>	Sim	6,400186	7,476223	0,682292	0,471236	0,0278
<b>1102</b>	Sim	8,159754	3,779504	1,390274	3,893488	0,657933
<b>1103</b>	Sim	10,43172	1,073035	1,607086	1,460058	3,229432
<b>1104</b>	Sim	5,182024	7,29473	0,227088	0,533037	1,033233
<b>1105</b>	Sim	6,864248	8,673437	0,790185	3,290924	-0,03243
<b>1106</b>	Não	9,310241	3,750848	1,008025	0,339908	0,379933
<b>1107</b>	Sim	8,855847	0,646368	1,368695	3,854862	1,552166
<b>1108</b>	Não	8,014735	8,498313	0,169546	0,563938	1,301966
<b>1109</b>	Sim	5,897453	3,754032	0,767579	1,630012	-0,06487
<b>1110</b>	Sim	9,861314	3,371942	1,371778	2,943291	0,440167
<b>1111</b>	Sim	6,032804	0,251542	1,146745	2,286652	1,190766
<b>1112</b>	Sim	2,745699	6,648362	0,087342	1,058059	0,967455

<b>1113</b>	Sim	6,013468	2,034628	0,430543	1,385827	0,595357
<b>1114</b>	Sim	7,792372	1,225871	1,322455	1,109812	0,292717
<b>1115</b>	Não	2,419098	2,430689	0,492196	0,097755	0,193491
<b>1116</b>	Sim	5,466231	2,522344	0,027744	0,632535	1,128697
<b>1117</b>	Sim	5,555397	1,37849	0,294907	1,78835	0,833499
<b>1118</b>	Sim	2,271781	5,282991	1,015218	0,385271	0,53086
<b>1119</b>	Não	1,539074	1,044866	0,639046	0,040252	0,213336
<b>1120</b>	Sim	3,605386	1,565467	1,053587	0,442775	1,227923
<b>1121</b>	Não	3,136299	0,619587	0,318591	0,54628	1,218001
<b>1122</b>	Não	-0,06203	0,593924	0,247793	0,224262	0,124033
<b>1123</b>	Sim	4,272189	9,70076	1,70847	0,230013	0,587915
<b>1124</b>	Sim	4,489288	3,614871	0,967885	0,54628	1,029471
<b>1125</b>	Sim	4,865333	0,769902	0,557069	1,449081	1,031952
<b>1126</b>	Sim	1,717405	8,351599	1,032162	0,787794	0,186049
<b>1127</b>	Sim	4,055091	7,028102	1,683318	0,465776	0,969935
<b>1128</b>	Sim	5,621301	4,465429	1,27064	0,862548	1,034432
<b>1129</b>	Sim	4,915731	0,795565	0,441557	1,040808	1,046836
<b>1130</b>	Não	3,310753	6,404848	0,454598	1,48246	1,925955
<b>1131</b>	Sim	4,562946	6,459841	1,440182	1,645588	1,428656
<b>1132</b>	Sim	5,737604	2,009077	1,383358	1,568317	0,353571
<b>1133</b>	Sim	1,221179	NR†	0,681686	2,258033	1,351043
<b>1134</b>	Sim	5,619566	18,21279	0,490929	1,385156	1,575259
<b>1135</b>	Sim	8,471287	24,83049	0,544959	1,201995	0,980225
<b>1138</b>	Sim	3,724011	8,239121	1,070355	1,153342	0,799128
<b>1139</b>	Sim	5,244929	10,46387	1,189782	0,174575	0,911236
<b>1140</b>	Sim	7,78911	30,97683	1,256937	1,087519	0,664023
<b>1141</b>	Não	9,600791	22,9451	0,6234	0,704025	0,321951
<b>1142</b>	Sim	5,334394	27,37575	0,685487	0,42356	0,830748

<b>1143</b>	Sim	7,414473	27,30034	1,538228	0,632478	1,431531
<b>1144</b>	Sim	8,197298	28,6201	1,159373	1,319332	0,500173
<b>1145</b>	Sim	7,850618	9,822842	0,600593	2,492708	0,61803
<b>1146</b>	Sim	5,065997	18,77841	0,940169	0,394941	0,701393
<b>1147</b>	Não	8,091057	15,87492	1,158105	0,154542	0,859493
<b>1149</b>	Sim	5,860006	5,76927	0,390259	1,2051	0,987492
<b>1150</b>	Sim	4,948573	12,0853	0,548643	1,073703	0,929511
<b>1151</b>	Não	8,124607	17,2324	1,490079	0,47303	0,532702
<b>1152</b>	Sim	8,202889	27,5153	0,894554	0,450505	1,005611
<b>1153</b>	Sim	2,149959	20,98743	0,359849	1,708163	1,081712
<b>1154</b>	Sim	5,177794	32,00759	0,305365	0,754595	0,621486
<b>1155</b>	Sim	3,416449	19,75907	1,15177	1,295201	0,706646
<b>1156</b>	Sim	0,35786	29,07707	1,737475	0,131397	0,98568
<b>1157</b>	Sim	3,282251	25,2516	1,789809	0,623198	1,081712
<b>1158</b>	Sim	3,950444	26,67299	0,753604	0,668248	0,887837
<b>1159</b>	Sim	2,197487	12,21342	1,323292	0,488047	0,353323
<b>1160</b>	Sim	0,824757	10,87977	1,629818	0,018771	0,603367
<b>1161</b>	Sim	2,916004	29,6737	1,797285	0,938551	1,415104
<b>1162</b>	Sim	3,746352	22,70714	0,526326	0,435488	0,817172
<b>1163</b>	Sim	2,203078	7,071852	0,959948	0,289074	0,353323
<b>1164</b>	Sim	1,906725	9,405739	1,58197	-0,03003	0,61605
<b>1165</b>	Sim	3,894528	12,45909	2,021572	0,397946	0,967561
<b>1166</b>	Sim	3,519893	12,8978	0,888176	0,503063	0,670408
<b>1167</b>	Sim	2,08286	14,56486	1,118444	1,761548	1,434355
<b>1168</b>	Sim	3,480752	7,773773	1,544589	0,907096	1,064592
<b>1169</b>	Sim	4,39777	8,59853	1,637294	0,923294	0,566834
<b>1170</b>	Sim	4,193677	4,216438	1,205168	1,259406	0,680608
<b>1171</b>	Sim	6,254332	11,7952	1,366655	0,988087	0,729368

<b>1172</b>	Sim	6,55454	18,31534	2,139697	1,433536	1,26979
<b>1173</b>	Sim	5,021335	3,687128	1,964753	0,69652	0,674513
<b>1174</b>	Sim	3,248679	2,544299	1,588577	0,08909	0,138153
<b>1175</b>	Sim	6,004158	16,24622	2,094541	0,672223	0,993484
<b>1177</b>	Sim	2,798367	0,727802	1,27793	0,52644	0,536359
<b>1178</b>	Sim	3,874112	10,29148	2,425649	0,979988	1,749263
<b>1179</b>	Sim	5,553847	12,01174	2,20429	0,988087	0,784222
<b>1180</b>	Sim	6,122097	15,5906	1,369078	1,40114	1,564382
<b>1182</b>	Sim	4,40305	5,130702	2,181968	1,364694	0,071108
<b>1183</b>	Sim	5,746837	11,47641	2,194989	0,631728	0,713114
<b>1184</b>	Sim	6,211445	13,41321	1,04541	1,287752	0,855331
<b>1185</b>	Sim	3,938442	1,642065	1,702047	0,301986	1,029852
<b>1186</b>	Não	1,011415	0,469161	0,498523	0,434363	0,190514
<b>1187</b>	Sim	5,278656	6,772767	1,791334	1,464425	0,407987
<b>1188</b>	Sim	5,514534	6,405859	0,757085	0,293712	1,252717
<b>1189</b>	Sim	5,937941	10,38772	1,091914	0,649477	1,718217
<b>1190</b>	Sim	7,98467	13,95455	1,50673	0,819085	1,380325
<b>1191</b>	Sim	7,232315	3,993887	0,829632	0,326807	0,440338
<b>1192</b>	Sim	5,533449	6,129174	3,644054	0,537783	1,074784
<b>1193</b>	Sim	8,737025	15,71089	2,684211	0,277165	1,996798
<b>1194</b>	Sim	8,9959	16,78756	0,766386	0,897684	0,819568
<b>1195</b>	Sim	6,617488	1,90672	2,367984	0,628793	0,415176
<b>1197</b>	Sim	7,960401	5,822414	2,942774	0,488142	1,461203
<b>1198</b>	Sim	8,745115	12,57714	2,598644	0,521236	2,345474
<b>1199</b>	Não	8,648037	1,443574	0,902178	5,088256	0,699149
<b>1200</b>	Sim	3,923571	5,076568	2,762338	0,550194	0,636243
<b>1201</b>	Sim	5,298844	4,084111	3,071125	0,053778	0,735095
<b>1202</b>	Sim	6,390972	9,377215	1,404421	0,848043	0,841135

<b>1203</b>	Sim	9,845333	2,424001	0,4669	1,195533	4,942493
<b>1204</b>	Sim	6,301984	3,524726	3,197616	-0,01728	2,267292
<b>1205</b>	Sim	7,361753	5,906623	3,606851	-0,02298	1,730212
<b>1206</b>	Sim	8,97972	10,37526	2,09082	0,307366	0,904197
<b>1207</b>	Sim	8,163928	20,19949	0,6957	0,321889	1,465072
<b>1208</b>	Sim	8,480934	14,30495	2,775359	0,185854	2,376068
<b>1209</b>	Sim	5,306759	6,699329	3,188315	-0,00662	0,839612
<b>1210</b>	Sim	2,96421	12,17335	1,575556	0,282733	1,220327
<b>1211</b>	Não	2,313731	2,015599	0,245015	0,357552	0,078182
<b>1212</b>	Sim	6,87532	8,084147	0,571701	0,311411	1,087756
<b>1213</b>	Sim	5,446736	5,611775	0,928723	0,011214	0,639057
<b>1214</b>	Sim	3,861707	4,060199	1,407085	0,218576	0,40111
<b>1215</b>	Sim	6,558315	11,70207	1,129401	0,285307	1,522859
<b>1216</b>	Não	7,381706	7,380862	0,630038	0,309572	0,795422
<b>1217</b>	Não	1,198035	0,362518	0,340687	0,140447	0
<b>1218</b>	Sim	3,931695	8,417663	2,27047	0,197251	0,295734
<b>1219</b>	Sim	5,920186	4,27771	0,728044	0,195781	0,571072
<b>1220</b>	Não	8,752653	10,46951	0,543699	0,22648	0,975581
<b>1221</b>	Sim	6,924724	5,408765	1,038396	0,301986	1,374625
<b>1222</b>	Não	1,280374	0,319016	0,396691	0,434363	0,292989
<b>1223</b>	Sim	5,83373	6,93859	0,935723	1,464425	0,149799
<b>1224</b>	Sim	8,320373	2,234885	0,655706	0,293712	0,321627
<b>1225</b>	Sim	4,655216	16,95524	0,893721	0,649477	1,480365
<b>1226</b>	Sim	5,391839	20,82723	1,374416	0,819085	0,956069
<b>1227</b>	Não	0,555486	0,18341	0,354688	0,326807	-0,0022

\*Persistência de IgG após 12 meses

† Não realizado

Anexo-Tabela 2. Índice de reatividade (IR) do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG totais e suas subclasses anti-rSAG1 de *Toxoplasma gondii* em plasma de 217 crianças avaliadas neste estudo.

Código do recém-nascido	Padrão-ouro*	IgG Total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1001	Sim	3,876315	9,911378	-1,46572	0,676373	-0,4825
1002	Não	4,447626	12,86573	-0,96501	0,575637	-1,73901
1003	Sim	2,426536	2,554086	0,946802	0,244646	-3,62879
1004	Sim	3,372579	10,19728	-0,42788	0,354976	-1,42739
1005	Sim	3,507727	8,424671	-0,13656	0,287818	-0,81422
1006	Sim	3,882458	13,49472	-0,4643	0,359773	0,080417
1007	Sim	2,887271	9,015542	0,436985	0,614013	3,538326
1008	Sim	3,593731	6,156491	0,264012	0,494088	4,573689
1009	Sim	2,580115	6,709241	0,391466	1,228025	1,196196
1010	Sim	4,189615	11,95083	1,338268	1,228025	3,779576
1011	Sim	2,365105	10,25446	0,591751	0,278225	1,336924
1012	Sim	2,979418	8,596214	-0,7101	0,263834	-2,36223
1015	Sim	3,550729	18,0692	-0,12745	0,402946	0,854425
1016	Não	3,92546	22,11	-0,03642	0,417337	-1,55807
1017	Sim	4,306334	9,835137	0,509816	0,398149	-4,29223
1018	Sim	3,679735	7,910042	0,336843	0,446119	-3,84994
1019	Sim	2,438823	4,803206	0,418778	0,757922	-2,71406
1020	Sim	1,953515	2,820931	0,600855	0,095939	-3,99067
1021	Sim	2,174668	3,183077	-0,13656	0,081549	-3,74942
1022	Sim	4,991404	6,497786	-0,09083	0,504669	0,36341
1023	Sim	4,193598	4,340958	-1,01931	0,445026	-0,51057
1024	Sim	5,161876	5,665087	-0,1312	0,275274	-0,58478
1025	Sim	4,500446	3,289845	-1,25143	0,041291	-0,51952
1026	Sim	3,654908	19,87558	-0,12111	0,275274	0,104928
1027	Sim	2,823007	5,856198	0,736729	0,389971	0,007678

<b>1028</b>	Não	10,11919	11,48033	1,261522	0,734064	0,16379
<b>1029</b>	Sim	8,537211	5,501277	0,393595	0,714795	0,589901
<b>1030</b>	Não	7,439374	6,743501	-0,72664	0,334917	-0,59502
<b>1031</b>	Sim	4,234511	0,491429	-1,71567	0,513845	-0,84454
<b>1032</b>	Sim	4,316337	1,747304	-0,55507	0,252334	-0,7908
<b>1033</b>	Sim	3,675365	3,808576	-0,10092	0,311977	-0,64109
<b>1034</b>	Sim	3,52535	4,532069	0,181659	0,137637	-0,29559
<b>1036</b>	Sim	3,348059	1,883812	-0,35323	0,481729	-0,09469
<b>1037</b>	Não	10,75334	20,65368	2,220279	0,417499	-0,18171
<b>1038</b>	Sim	9,587315	23,20638	0,272489	0,362444	0,399239
<b>1039</b>	Sim	7,043881	22,49654	0,888112	0,380796	0,39796
<b>1040</b>	Não	0,211385	0,136508	-0,52479	0,128461	-0,23545
<b>1041</b>	Não	5,871037	8,190487	0,343134	0,19728	-0,75881
<b>1042</b>	Não	3,873112	1,35143	0,100922	0,206455	-0,42739
<b>1043</b>	Não	12,24724	26,81262	-1,03049	0,61654	1,196903
<b>1044</b>	Não	10,15068	11,92204	2,006746	0,797875	2,292373
<b>1045</b>	Sim	3,560004	1,085273	1,301673	1,305614	-0,97375
<b>1046</b>	Sim	5,147994	0,925674	-0,50169	0,725341	-1,91707
<b>1047</b>	Sim	4,950793	3,287738	0,881341	0,961077	0,355014
<b>1048</b>	Sim	3,39394	2,010947	0,2983	1,033611	0,486876
<b>1049</b>	Não	14,4476	17,33245	1,410146	1,496017	4,747038
<b>1050</b>	Não	12,68316	13,19883	1,084728	1,196813	3,103833
<b>1051</b>	Não	10,76304	16,45465	2,033865	0,661874	3,81386
<b>1052</b>	Sim	6,735984	8,969461	2,359283	0,689074	1,764924
<b>1053</b>	Sim	5,064962	0,638396	1,640651	0,734408	0,436159
<b>1054</b>	Sim	10,5866	6,990434	1,979628	0,743475	1,054897
<b>1055</b>	Sim	5,013067	3,08026	0,74575	0,598407	0,202865
<b>1056</b>	Sim	4,462979	3,926134	0,569482	0,834143	0,486876



<b>1057</b>	Não	12,79733	0,750115	1,274555	1,369082	3,671854
<b>1058</b>	Não	12,70392	2,808942	1,532178	0,933877	3,732714
<b>1059</b>	Sim	3,933649	17,28457	0,718632	0,607473	0,933178
<b>1060</b>	Sim	4,826244	11,01233	1,450823	0,698141	0,902749
<b>1061</b>	Sim	8,500417	2,090746	1,572855	0,743475	1,927216
<b>1062</b>	Não	11,6764	1,675789	-0,67795	0,598407	-0,40573
<b>1063</b>	Não	4,920009	23,66888	1,218657	0,458396	2,587438
<b>1064</b>	Sim	1,648296	3,776699	0,680181	0,261286	0,865484
<b>1065</b>	Não	0,970318	1,36055	0,580988	0,275037	0,189325
<b>1066</b>	Sim	2,556414	7,787976	1,147805	0,591331	0,036062
<b>1067</b>	Sim	2,556414	5,254538	1,30368	0,4859	-0,15326
<b>1068</b>	Sim	2,245415	6,80275	0,65184	0,24295	0,054093
<b>1069</b>	Não	5,821907	18,8835	2,139736	0,673842	3,290644
<b>1070</b>	Sim	1,859776	0,867937	-0,12753	0,779273	-0,1172
<b>1071</b>	Sim	2,208095	6,966954	-1,34619	0,293373	-2,54236
<b>1072</b>	Sim	1,853556	8,304046	1,246998	0,19711	0,324557
<b>1073</b>	Sim	2,114795	5,090334	0,765203	0,412556	1,289211
<b>1074</b>	Não	0,81855	0,633359	0,892737	0,559243	0,171294
<b>1075</b>	Sim	2,077475	4,597721	1,133635	0,531739	0,279479
<b>1076</b>	Sim	2,743014	5,86444	1,147805	0,430892	0,19834
<b>1077</b>	Sim	3,520512	3,213713	2,408974	0,83428	1,478536
<b>1078</b>	Sim	1,766476	1,290177	-1,79965	0,591331	-1,89325
<b>1079</b>	Sim	2,121015	3,026051	1,048612	0,233782	0,685175
<b>1080</b>	Sim	1,828676	11,37701	1,346191	-0,01834	0,730252
<b>1081</b>	Sim	1,001418	1,78279	-0,8644	0,320877	-1,55967
<b>1082</b>	Sim	1,268877	1,876621	-1,71462	0,293373	-0,66714
<b>1083</b>	Sim	4,349775	4,868587	-0,9771	0,526269	0,504517
<b>1084</b>	Sim	3,043677	1,397263	-1,37279	0,352296	0,167767

<b>1086</b>	Sim	5,294365	3,438576	-1,00133	2,435623	0,148316
<b>1087</b>	Sim	4,256483	4,246369	0,024226	0,504522	0,200591
<b>1088</b>	Não	6,822034	6,789824	-0,22611	0,700242	0,150747
<b>1089</b>	Sim	4,419745	1,681082	0,750996	0,51757	0,674716
<b>1090</b>	Sim	5,002825	4,562936	-1,0094	0,800276	0,132512
<b>1091</b>	Sim	6,961973	5,599967	-2,01073	0,561063	0,559224
<b>1092</b>	Não	8,163117	15,14065	0,605642	0,400138	0,790207
<b>1093</b>	Sim	3,790019	1,735662	0,209956	0,19137	0,109413
<b>1094</b>	Sim	4,734608	4,388278	0,201881	0,413186	0,200591
<b>1095</b>	Sim	4,583007	4,955916	0,161504	0,77853	-0,64189
<b>1096</b>	Sim	4,058235	3,37308	0,161504	0,804626	0,15561
<b>1097</b>	Não	3,696726	1,681082	0,145354	0,417535	0,306357
<b>1098</b>	Não	8,606258	14,85683	0,855974	0,534967	0,804796
<b>1099</b>	Sim	5,644212	6,538753	0,573341	0,38709	0,354986
<b>1100</b>	Sim	4,489714	2,477958	0,306859	0,64805	0,497223
<b>1101</b>	Sim	3,032015	1,419095	0,064602	0,091336	0,250435
<b>1102</b>	Sim	3,755034	3,547738	-1,70387	0,374042	-0,06443
<b>1103</b>	Sim	7,266674	5,549652	0,455153	0,31346	0,938036
<b>1104</b>	Sim	6,43043	1,025237	0,098538	0,143669	0,211891
<b>1105</b>	Sim	4,325401	3,424886	0,187692	0,835895	0,254746
<b>1106</b>	Não	6,257414	3,974651	0,269338	0,40924	0,252365
<b>1107</b>	Sim	3,763099	2,399649	0,136077	0,226388	0,35474
<b>1108</b>	Não	9,674481	16,47065	0,122	0,50502	0,595201
<b>1109</b>	Sim	4,62818	2,161913	0,183	0,113194	-0,13571
<b>1110</b>	Sim	5,017466	1,612148	0,107923	0,222035	0,128563
<b>1111</b>	Sim	3,344977	0,928657	0,089154	0,104487	0,716622
<b>1112</b>	Sim	8,074083	4,77701	0,272153	0,539849	1,059457
<b>1113</b>	Sim	4,137967	1,300119	-0,11731	0,15673	-0,11666

1114	Sim	3,402649	1,069812	0,042231	0,261217	-0,04524
1115	Não	4,671434	0,950944	0,051615	0,104487	0,040474
1116	Sim	4,98863	1,597289	-0,04223	0,570324	0,142848
1117	Sim	4,714688	3,395169	0,211153	0,15673	-0,1119
1118	Sim	3,864025	2,355073	0,075077	0,091426	-0,90947
1119	Não	1,744579	0,356604	0,070384	0,078365	0,483303
1120	Sim	3,388231	1,411558	0,084461	0,25251	0,628532
1121	Não	5,579768	2,236205	-0,06569	0,104487	0,138087
1122	Não	-0,41812	0,09658	-0,02815	0,195913	-0,02857
1123	Sim	9,904644	6,430189	1,287383	0,871084	1,062953
1124	Sim	11,03218	5,071699	1,665635	1,043532	0,916119
1125	Sim	9,219278	7,581672	0,418068	0,495235	0,798013
1126	Sim	8,268609	4,657682	-1,22766	0,358161	-0,57138
1127	Sim	7,870655	3,519138	0,36498	0,504079	-0,00958
1128	Sim	9,241387	4,502426	0,19908	0,375848	0,134066
1129	Sim	13,48623	16,67709	0,703416	0,605779	2,738781
1130	Não	16,00661	15,26685	1,579367	0,663262	2,508953
1131	Sim	11,0764	10,82911	-1,12812	1,304415	1,554529
1132	Sim	10,8332	7,387602	0,637056	1,193871	0,868238
1133	Sim	8,312826	9,587063	-0,073	0,627888	1,302357
1134	Sim	6,743117	11,35957	-1,83817	0,844553	0,526689
1135	Sim	8,180175	4,47655	-0,35834	0,367005	0,296861
1138	Sim	5,880882	3,44151	1,081668	0,747275	1,350238
1139	Sim	8,777107	5,886793	0,676872	0,548296	1,21298
1140	Sim	9,528798	5,809165	1,267475	0,649997	0,619258
1141	Não	10,8111	14,50351	-1,40683	0,256461	-1,34705
1142	Sim	12,44713	17,99677	-1,69882	0,159183	-0,67672
1143	Sim	8,173356	7,867835	0,754418	1,0628	1,048715

<b>1144</b>	Sim	4,407302	1,502041	0,362291	0,635237	0,124847
<b>1145</b>	Sim	5,883188	10,1209	0,647862	0,629129	0,653366
<b>1146</b>	Sim	5,160513	5,57901	-0,05967	0,171025	-0,49731
<b>1147</b>	Não	6,229258	12,08786	0,443274	0,323727	0,068666
<b>1149</b>	Sim	7,613537	8,440041	0,400651	0,702425	1,165239
<b>1150</b>	Sim	5,944259	5,686299	-0,02984	0,543616	0,771971
<b>1151</b>	Não	9,089424	6,866474	-0,6436	0,568048	-0,58262
<b>1152</b>	Sim	5,679618	4,720701	-0,66065	0,806262	-1,16316
<b>1153</b>	Sim	4,448016	6,008165	-1,10818	0,067189	-1,09449
<b>1154</b>	Sim	2,422489	4,291546	-0,93343	0,042756	-0,95924
<b>1155</b>	Sim	3,257128	5,865113	-0,52852	0,360375	-0,71787
<b>1156</b>	Sim	4,274981	6,043928	-0,17049	0,372591	-0,17479
<b>1157</b>	Sim	3,908554	19,70535	0,323931	0,445887	1,764505
<b>1158</b>	Sim	5,547297	16,55822	0,353766	0,299294	1,483599
<b>1159</b>	Sim	4,356409	5,042567	-1,01441	0,054972	-0,66585
<b>1160</b>	Sim	4,997656	6,365794	0,532781	0,287078	0,316279
<b>1161</b>	Sim	4,448016	14,48397	-0,6777	0,054972	-0,64504
<b>1162</b>	Sim	4,336052	12,15938	0,055409	0,042756	0,670012
<b>1163</b>	Sim	5,031549	4,890074	0,829149	1,249395	0,970399
<b>1164</b>	Sim	3,450205	1,594917	0,345734	0,461961	0,261922
<b>1165</b>	Sim	4,056045	1,670148	0,636395	2,215313	0,283391
<b>1166</b>	Sim	2,033157	2,392375	0,336555	1,312389	-0,54961
<b>1167</b>	Sim	4,056045	1,760427	0,284542	1,669359	0,03435
<b>1168</b>	Sim	5,021281	2,666219	0,128503	0,157487	0,158871
<b>1169</b>	Sim	4,990476	4,258126	1,04332	0,934421	0,704183
<b>1170</b>	Sim	3,881481	5,386605	0,734302	0,913423	0,489493
<b>1171</b>	Sim	2,94705	4,363451	0,937458	0,955419	0,583957
<b>1172</b>	Sim	4,980207	10,00584	0,471177	0,482959	0,824409

<b>1173</b>	Sim	4,590005	3,520854	0,59356	1,238895	0,373561
<b>1174</b>	Sim	0,893357	1,203711	0,342674	1,228396	0,012881
<b>1175</b>	Sim	3,080541	3,15974	0,235588	0,82943	0,107345
<b>1177</b>	Sim	4,035508	4,363451	1,000486	0,902924	0,631188
<b>1178</b>	Sim	4,333294	10,75816	0,461998	1,690357	-1,50283
<b>1179</b>	Sim	3,789065	4,604193	0,663931	1,102407	0,850172
<b>1180</b>	Sim	5,503899	9,539407	0,385508	0,58795	-1,40837
<b>1182</b>	Sim	2,259063	2,618071	0,229469	2,813763	-0,05153
<b>1183</b>	Sim	3,081252	43,52509	1,07105	0,599568	-1,32735
<b>1184</b>	Sim	1,866192	24,29856	0,981485	0,824406	-0,39392
<b>1185</b>	Sim	2,232454	6,275162	0,541123	0,344752	-1,28453
<b>1186</b>	Não	0,680201	-2,8309	0,235109	0,269806	-0,76216
<b>1187</b>	Sim	2,44756	13,87141	0,294819	0,494644	-0,71078
<b>1188</b>	Sim	2,744058	12,47955	-0,05971	0,494644	0,702212
<b>1189</b>	Sim	2,49407	11,55951	-0,62696	0,2773	4,684266
<b>1190</b>	Sim	2,302218	10,96974	0,298551	0,509633	1,789783
<b>1191</b>	Sim	2,749872	11,3236	0,97029	0,247322	0,23978
<b>1192</b>	Sim	2,127808	2,854491	-0,16793	0,254817	3,254152
<b>1193</b>	Sim	2,261523	28,42696	-0,44409	-0,08244	2,526249
<b>1194</b>	Sim	2,005721	19,15576	0,768768	0,19486	-0,85636
<b>1195</b>	Sim	2,232454	6,912115	0,384384	0,359741	-1,07901
<b>1197</b>	Sim	3,151016	34,72571	1,489021	0,202354	-1,50719
<b>1198</b>	Sim	2,465002	16,34845	0,835942	0,801923	0,864919
<b>1199</b>	Não	2,71499	44,75182	0,787427	0,314773	-0,55663
<b>1200</b>	Sim	2,569648	12,97496	0,186594	0,007495	0,222652
<b>1201</b>	Sim	1,790614	7,431113	0,488877	-0,25482	-1,22459
<b>1202</b>	Sim	1,296451	3,37349	0,522464	-0,14989	-0,6337
<b>1203</b>	Sim	4,08191	8,901695	1,112749	2,175925	1,621953

<b>1204</b>	Sim	4,893325	22,80472	0,504939	2,166423	2,50335
<b>1205</b>	Sim	3,253937	3,550436	0,450478	0,864669	0,749642
<b>1206</b>	Sim	2,19413	0,298715	-0,05715	-0,10452	-0,42253
<b>1207</b>	Sim	1,962298	0,27311	0	0,199539	-0,24534
<b>1208</b>	Sim	3,759001	1,425295	0,228601	0,722141	0,054519
<b>1209</b>	Sim	2,715754	2,423855	0,783294	1,026201	0,908657
<b>1210</b>	Sim	3,1463	3,209048	0,796742	1,035702	1,113105
<b>1211</b>	Não	1,655947	0,588894	0,426946	0,522602	-1,76734
<b>1212</b>	Sim	2,955866	1,382622	0,158004	0,66513	-1,36753
<b>1213</b>	Sim	2,84823	5,863341	0,295837	0,009502	-0,20899
<b>1214</b>	Sim	3,303615	1,459434	0,134471	0,342067	-0,7133
<b>1215</b>	Sim	2,260368	0,503547	0,107577	0,636624	-0,07269
<b>1216</b>	Não	5,174836	3,627249	0,026894	0,646126	0,322573
<b>1217</b>	Não	2,52532	1,109511	0,578226	0,56061	-0,70875
<b>1218</b>	Sim	3,585126	3,439485	0,652185	0,380074	-0,83142
<b>1219</b>	Sim	3,345014	1,792288	0,766486	0,522602	0,558824
<b>1220</b>	Não	5,307311	23,2656	0,608482	0,864669	-0,82688
<b>1221</b>	Sim	2,690915	2,756709	0,356349	0,10452	-0,65423
<b>1222</b>	Não	0,389148	0,059743	0,184898	0,266052	0,149928
<b>1223</b>	Sim	3,597541	18,76905	0,141053	0,254036	0,188801
<b>1224</b>	Sim	3,136214	45,19391	-0,49559	0,654335	-0,83649
<b>1225</b>	Sim	1,873635	3,375137	-0,16774	0,223244	0,322535
<b>1226</b>	Sim	2,365312	7,326517	0,167739	0,307922	0,039334
<b>1227</b>	Não	0,283271	-0,74088	-0,14868	0,23864	-0,19929

\*Persistência de IgG após 12 meses

**Anexo-Tabela 3. Índice de reatividade (IR) do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG totais e suas subclasses anti-rMIC3 de *Toxoplasma gondii* em plasma de 217 crianças avaliadas neste estudo.**

<b>Código do recém-nascido</b>	<b>Padrão-ouro*</b>	<b>IgG Total</b>	<b>IgG1</b>	<b>IgG2</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG4</b>
<b>1001</b>	Sim	0,856936	11,04162	-0,48056	-1,14531	0,856797
<b>1002</b>	Não	2,807165	0,231869	-1,06252	-1,64661	-0,51078
<b>1003</b>	Sim	4,61069	0,073776	-0,80681	0,132285	-0,60415
<b>1004</b>	Sim	3,361379	6,590057	2,993565	1,590906	-0,62063
<b>1005</b>	Sim	4,064626	3,456507	0,057314	0,139248	0,417414
<b>1006</b>	Sim	2,576631	2,810594	0,678953	0,738013	0,450367
<b>1007</b>	Sim	0,412168	9,610137	0,996386	3,390684	2,520959
<b>1008</b>	Sim	1,644014	9,590925	1,644477	3,115669	-0,12083
<b>1009</b>	Sim	4,341733	1,44894	-1,26091	3,481195	-0,08788
<b>1010</b>	Sim	4,296325	13,11029	2,244072	7,453238	0,845812
<b>1011</b>	Sim	4,495423	7,122499	-0,48056	0,567435	0,060415
<b>1012</b>	Sim	4,603704	2,583652	-0,03527	0,64054	-0,31306
<b>1015</b>	Sim	1,195752	0,087286	-1,26532	-0,79719	-0,18674
<b>1016</b>	Não	0,330666	0,069828	-0,62605	-0,97473	-0,04943
<b>1017</b>	Sim	2,673269	0,916935	-0,53787	-0,54307	-0,60415
<b>1018</b>	Sim	4,256738	4,068238	-1,18155	0,090511	-0,04943
<b>1019</b>	Sim	1,323827	0,231869	0,21603	-0,92948	-0,93369
<b>1020</b>	Sim	4,659591	6,459129	2,790761	2,65267	2,965834
<b>1021</b>	Sim	3,640815	11,27724	0,11022	0,999103	-0,30757
<b>1022</b>	Sim	7,820618	16,34673	2,927434	1,883489	-0,43938
<b>1023</b>	Sim	8,917042	3,730975	-0,42859	-0,11772	-1,18198
<b>1024</b>	Sim	7,48279	4,078778	5,459915	0,261863	0,163031
<b>1025</b>	Sim	5,010779	1,749553	4,230036	-0,06006	1,120841
<b>1026</b>	Sim	4,583942	13,11111	11,90746	0,201802	11,65674
<b>1027</b>	Sim	0,055483	2,391624	2,273412	1,559164	0,957809

<b>1028</b>	Não	1,086309	0,042158	-1,86345	0,336337	-0,24455
<b>1029</b>	Sim	1,047874	0,579671	0,391325	0,317118	25,39213
<b>1030</b>	Não	0,746458	0,179171	-0,29815	-0,77117	-0,73364
<b>1031</b>	Sim	8,211042	1,022329	-2,47839	-0,88409	-0,61137
<b>1032</b>	Sim	3,657444	11,76206	-0,65221	-0,3988	0,326063
<b>1033</b>	Sim	3,736338	4,142015	0,242249	0,485287	1,181977
<b>1034</b>	Sim	5,196888	17,71686	1,956625	0,903306	4,605636
<b>1036</b>	Sim	2,688464	6,904285	0,726746	0,391593	0,713262
<b>1037</b>	Não	-0,03699	3,063722	-1,39759	-0,15375	-0,06114
<b>1038</b>	Sim	3,49561	2,940514	7,696057	0,965769	1,283872
<b>1039</b>	Sim	NR†	3,343036	2,534295	1,030634	2,425091
<b>1040</b>	Não	1,060011	3,980293	-1,5094	-1,43904	-1,63031
<b>1041</b>	Não	3,13553	0,398029	-2,34795	-1,14114	-2,3232
<b>1042</b>	Não	0,728252	0,039803	-2,96289	-0,80961	-1,48766
<b>1043</b>	Não	5,755214	0,457734	-2,79518	0,006762	0,101895
<b>1044</b>	Não	6,926486	1,333398	0,068202	-0,02705	0,194852
<b>1045</b>	Sim	0,746458	16,69733	0,242867	9,010637	8,003348
<b>1046</b>	Sim	4,144601	0,750656	0,088996	1,920466	1,075292
<b>1047</b>	Sim	4,874683	19,38403	0,726937	4,496866	5,159958
<b>1048</b>	Sim	4,289674	1,86791	0,48407	0,530833	0,808273
<b>1049</b>	Não	1,398832	-0,15711	0,009149	-0,22315	-0,20207
<b>1050</b>	Não	3,655127	2,388176	-0,08484	-0,04734	0,079384
<b>1051</b>	Não	1,241965	0,146158	-0,11894	-0,26711	0,129901
<b>1052</b>	Sim	2,336498	65,13749	0,596355	1,163099	5,592962
<b>1053</b>	Sim	1,776257	17,25457	0,191299	1,582356	1,075292
<b>1054</b>	Sim	3,604411	13,01556	0,349329	0,24682	1,010341
<b>1055</b>	Sim	4,677714	12,02048	1,00141	0,794559	4,077449
<b>1056</b>	Sim	0,877514	12,63743	0,392579	1,528258	4,748605



<b>1057</b>	Não	2,474494	0,378128	-0,12892	-0,24682	-0,2165
<b>1058</b>	Não	0,332606	1,731427	-0,06737	-0,34149	-0,05773
<b>1059</b>	Sim	1,241965	6,328666	0,003327	3,769929	0,324753
<b>1060</b>	Sim	1,92133	88,10378	0,461614	2,062472	8,046648
<b>1061</b>	Sim	2,152503	71,56567	0,25867	0,58155	6,560003
<b>1062</b>	Não	1,396473	1,094581	0,264492	0,006762	0,591771
<b>1063</b>	Não	4,121012	1,791132	0,020793	0,051384	-0,15877
<b>1064</b>	Sim	3,237601	2,332431	0,268281	1,998845	2,002564
<b>1065</b>	Não	0,037743	-0,03045	-0,27319	0,061661	-0,08295
<b>1066</b>	Sim	0,014397	0,761237	0,564371	0,750209	3,75629
<b>1067</b>	Sim	4,362384	1,132721	0,022902	5,559769	2,654287
<b>1068</b>	Sim	4,375341	0,444563	0,567643	1,469588	0,485829
<b>1069</b>	Não	4,415654	0,694248	0,024538	0,205537	0,296237
<b>1070</b>	Sim	1,744953	2,39333	0,662523	3,293726	3,28231
<b>1071</b>	Sim	2,335243	7,387048	1,024048	4,043935	17,01587
<b>1072</b>	Sim	2,045857	1,711262	0,579094	1,443896	0,69912
<b>1073</b>	Sim	1,65713	1,157081	0,363161	4,717068	4,870142
<b>1074</b>	Não	3,053669	0,170517	1,202356	0,056523	2,192156
<b>1075</b>	Sim	2,574238	0,109618	-0,05562	0,755348	0,308087
<b>1076</b>	Sim	4,792863	0,840406	0,472763	0,452181	2,464695
<b>1077</b>	Sim	2,643345	0,036539	0,085065	3,355387	0,201441
<b>1078</b>	Sim	2,842028	4,037603	0,037625	8,504082	10,86599
<b>1079</b>	Sim	2,500812	1,82697	0,045804	1,808723	1,244197
<b>1080</b>	Sim	1,454128	9,567231	0,744316	2,384226	4,976787
<b>1081</b>	Sim	1,01789	11,34548	0,139048	6,890619	18,21267
<b>1082</b>	Sim	2,487854	4,591784	-0,31081	0,986576	12,86855
<b>1083</b>	Sim	3,281146	25,57274	-0,13087	-0,92546	7,168944
<b>1084</b>	Sim	4,48908	110,4645	0,512504	0,99588	23,2701

<b>1086</b>	Sim	2,679412	9,33351	1,205644	2,464552	6,165312
<b>1087</b>	Sim	0,556406	51,14548	2,835575	-2,86693	4,584463
<b>1088</b>	Não	3,089892	0,269755	-0,68894	-3,11841	-0,10539
<b>1089</b>	Sim	1,232379	4,693731	0,554512	-1,016	0,147546
<b>1090</b>	Sim	-0,3361	12,73242	-0,4705	-0,43255	0,252936
<b>1091</b>	Sim	0,236308	2,050135	-0,5167	-0,0503	0,495333
<b>1092</b>	Não	1,539297	2,61662	-0,4705	-0,34202	0,400482
<b>1093</b>	Sim	2,498651	7,472203	-0,21844	0,070416	1,348991
<b>1094</b>	Sim	3,849655	3,749589	0,617525	2,464552	2,950918
<b>1095</b>	Sim	4,029475	4,289099	1,067016	-7,31318	2,476664
<b>1096</b>	Sim	1,112813	0,458583	-0,46629	-1,57933	0,052695
<b>1097</b>	Não	1,313345	0,323706	-0,69314	-0,6941	0,400482
<b>1098</b>	Não	-0,44343	-0,1079	-0,86117	-1,42843	-0,01054
<b>1099</b>	Sim	0,388825	80,49478	0,44529	-0,3219	3,45679
<b>1100</b>	Sim	1,472453	46,55965	0,180637	-0,82487	3,425173
<b>1101</b>	Sim	2,687886	19,47628	1,491302	0,231366	3,203854
<b>1102</b>	Sim	3,450473	22,20081	0,659534	2,917225	14,00632
<b>1103</b>	Sim	3,064472	2,998819	-0,021	-0,56658	0,31617
<b>1104</b>	Sim	2,628573	7,971221	0,915786	-0,20135	0,168624
<b>1105</b>	Sim	2,724603	3,101343	2,248998	0,571259	0,682252
<b>1106</b>	Não	1,508036	-0,05126	0,393575	-0,03278	-0,12183
<b>1107</b>	Sim	5,035061	8,842673	3,696791	0,65086	2,180769
<b>1108</b>	Não	1,390124	0,128155	-0,56225	-0,55253	0,036549
<b>1109</b>	Sim	5,115738	13,9176	2,094379	0,177933	0,328943
<b>1110</b>	Sim	5,018512	27,32258	6,114464	0,449515	0,621336
<b>1111</b>	Sim	3,042964	6,02327	1,630524	0,182615	2,119853
<b>1112</b>	Sim	0,612316	15,53235	3,359441	-0,37928	3,545272
<b>1113</b>	Sim	2,072774	2,511832	2,61446	0,215393	1,169574

<b>1114</b>	Sim	4,422745	7,586757	8,96788	0,660225	4,300622
<b>1115</b>	Não	0,866759	-0,35883	1,012049	-0,0796	0,024366
<b>1116</b>	Sim	4,853021	1,589118	-1,30723	-0,81475	1,145208
<b>1117</b>	Sim	1,100515	4,818616	0,534137	-0,01873	0,219295
<b>1118</b>	Sim	3,088474	12,66168	-0,71687	-0,08897	1,03556
<b>1119</b>	Não	0,370286	-0,46136	0,253012	-1,34855	0,121831
<b>1120</b>	Sim	-0,01448	-0,10252	0,028112	-0,67427	0
<b>1121</b>	Não	1,435634	0,53825	0,4498	-0,36991	0,328943
<b>1122</b>	Não	0,016549	-0,07689	-0,73092	-0,52912	-0,17056
<b>1123</b>	Sim	5,533602	121,6798	5,692776	2,545994	2,631542
<b>1124</b>	Sim	4,197263	12,6647	3,092372	1,338842	0,47514
<b>1125</b>	Sim	4,0959	18,968	0,172822	1,887547	0,711492
<b>1126</b>	Sim	3,910068	76,24961	4,666185	7,462396	12,24207
<b>1127</b>	Sim	3,414146	30,84841	2,559407	6,54057	2,603915
<b>1128</b>	Sim	5,375792	51,41402	2,238452	3,204441	1,511004
<b>1129</b>	Sim	4,225254	53,79591	0,098755	1,97534	0,256724
<b>1130</b>	Não	3,568433	3,543791	-0,04115	-0,17559	0,066015
<b>1131</b>	Sim	3,780026	127,286	6,262728	8,011101	9,528128
<b>1132</b>	Sim	1,809564	38,11028	0,493776	6,452778	2,574575
<b>1133</b>	Sim	1,362132	82,81434	0,946404	5,92602	3,066018
<b>1134</b>	Sim	2,627283	84,61528	3,703321	7,857464	6,579469
<b>1135</b>	Sim	2,973327	98,32568	2,427733	1,646117	1,782398
<b>1138</b>	Sim	3,762393	17,63181	-0,37033	4,279903	0,11736
<b>1139</b>	Sim	0,218206	2,06237	-0,8065	0,065845	0
<b>1140</b>	Sim	2,065239	50,22307	0,19751	0,175586	0,894866
<b>1141</b>	Não	1,229886	1,103804	-0,52669	-0,72429	0,02934
<b>1142</b>	Sim	1,448092	1,219994	-0,6666	-0,65845	-0,11002
<b>1143</b>	Sim	3,848353	91,61482	1,275589	5,917775	4,965775

<b>1144</b>	Sim	4,738808	16,17187	0,403251	5,96161	0,513448
<b>1145</b>	Sim	4,388357	18,26106	-0,71598	10,87117	1,525674
<b>1146</b>	Sim	6,816672	39,38509	4,921303	4,076689	2,772619
<b>1147</b>	Não	5,904503	-0,10317	-4,08393	0,591777	0,112174
<b>1149</b>	Sim	0,359808	16,71352	2,322967	1,556156	3,9448
<b>1150</b>	Sim	3,180645	70,4908	-0,2248	2,323275	4,225236
<b>1151</b>	Não	2,424486	37,47645	-3,93406	-0,28493	1,645225
<b>1152</b>	Sim	1,359118	41,55166	-0,14987	1,556156	6,543507
<b>1153</b>	Sim	2,390754	68,0921	9,629074	15,64923	10,69396
<b>1154</b>	Sim	5,636052	25,84405	12,28925	1,906839	17,91051
<b>1155</b>	Sim	5,790657	34,25239	31,5474	10,34515	26,79099
<b>1156</b>	Sim	3,002146	6,886587	29,4867	6,136952	18,17225
<b>1157</b>	Sim	-0,34856	82,53588	9,516673	2,410945	15,01267
<b>1158</b>	Sim	2,092788	16,55876	-2,84751	-0,10959	0,691742
<b>1159</b>	Sim	1,922723	63,93951	19,67029	7,75886	26,08055
<b>1160</b>	Sim	0,546739	56,92396	5,133009	0,986296	2,393054
<b>1161</b>	Sim	1,305709	40,75209	4,720869	4,799973	4,692629
<b>1162</b>	Sim	1,789201	8,253588	-1,53616	0,526024	0,878699
<b>1163</b>	Sim	5,966344	223,911	11,0903	1,263137	7,14177
<b>1164</b>	Sim	1,422365	129,3139	6,631697	0,649166	4,767412
<b>1165</b>	Sim	3,893233	64,31352	-0,14987	0,543579	1,028265
<b>1166</b>	Sim	4,938289	153,9778	15,36156	0,778217	6,225679
<b>1167</b>	Sim	0,041525	2,560053	2,847508	0,129051	0,785221
<b>1168</b>	Sim	1,426226	21,91655	0,497479	0,007821	2,016491
<b>1169</b>	Sim	4,384089	51,76302	0,534058	0,215085	0,976238
<b>1170</b>	Sim	3,253329	112,2677	3,05803	6,061492	7,041714
<b>1171</b>	Sim	2,708712	207,5516	4,096882	0,527936	7,505827
<b>1172</b>	Sim	3,106395	113,8911	1,865545	0,813413	1,824444

<b>1173</b>	Sim	2,964251	99,46742	1,36075	0,289387	1,008245
<b>1174</b>	Sim	4,690736	2,185411	0,12437	0,692183	0,800195
<b>1175</b>	Sim	4,768994	8,179681	0,951062	0,175979	0,720175
<b>1177</b>	Sim	3,615875	0,374642	0,065843	-0,54358	0,144035
<b>1178</b>	Sim	2,933906	77,98795	4,616309	0,477098	28,759
<b>1179</b>	Sim	2,967445	53,69867	0,387741	0,277655	1,216296
<b>1180</b>	Sim	2,366929	37,90127	0,256055	-0,00782	1,792436
<b>1182</b>	Sim	0,998199	7,118195	0,08779	1,106711	-0,11203
<b>1183</b>	Sim	5,04849	213,6371	0,54869	0,786285	0,096023
<b>1184</b>	Sim	5,209799	291,1245	2,267917	1,485204	13,18721
<b>1185</b>	Sim	4,120565	334,3843	3,628667	0,301409	9,186237
<b>1186</b>	Não	1,1136	-0,19015	-0,35848	-0,25773	-1,2323
<b>1187</b>	Sim	2,558629	148,985	2,516656	2,428746	3,344814
<b>1188</b>	Sim	3,519772	2,091685	-0,26337	-0,03931	0,064016
<b>1189</b>	Sim	1,785737	14,45164	0,036579	-0,58535	0,128031
<b>1190</b>	Sim	1,616046	90,98829	0,928306	-0,66397	18,0013
<b>1191</b>	Sim	0,624411	26,05098	0,121461	-0,14852	2,646439
<b>1192</b>	Sim	3,527726	142,7099	2,889026	1,105167	26,85033
<b>1193</b>	Sim	3,045166	21,48731	2,325102	-1,62062	11,99168
<b>1194</b>	Sim	4,422583	49,82013	3,279434	-0,02184	6,864202
<b>1195</b>	Sim	4,309898	3,517833	-0,09543	-0,14852	-0,11027
<b>1197</b>	Sim	2,280229	58,28194	2,51163	-0,24899	3,39075
<b>1198</b>	Sim	1,259429	4,278446	-0,42945	-0,81249	0,496207
<b>1199</b>	Não	NR†	96,78796	-0,4468	-0,89986	-0,49621
<b>1200</b>	Sim	0,494491	3,89814	-0,26895	-0,1791	0,137835
<b>1201</b>	Sim	0,641646	-0,47538	-0,16918	-0,77755	3,004811
<b>1202</b>	Sim	NR†	3,517833	-0,04772	-0,24462	0,303238
<b>1203</b>	Sim	NR†	28,22847	3,192677	0,740461	11,35764

<b>1204</b>	Sim	2,052206	1,249226	-0,31666	-0,20194	-0,30324
<b>1205</b>	Sim	4,316526	30,24335	2,229668	2,030658	35,80963
<b>1206</b>	Sim	3,818058	16,7638	3,118933	1,806276	29,80001
<b>1207</b>	Sim	2,467155	3,082767	0,767804	1,267759	5,540983
<b>1208</b>	Sim	4,020716	2,135773	0,099771	0,179506	9,896581
<b>1209</b>	Sim	3,641668	25,38749	0,594289	7,157789	13,37003
<b>1210</b>	Sim	3,805922	38,94764	2,290399	11,76884	16,76078
<b>1211</b>	Não	-0,02667	0,443274	0,322605	-0,0561	0,922647
<b>1212</b>	Sim	1,169433	32,76195	2,213223	1,211663	4,835942
<b>1213</b>	Sim	0,473108	13,11687	2,655867	1,211663	5,45104
<b>1214</b>	Sim	1,040276	11,34378	2,820921	0,426326	2,969438
<b>1215</b>	Sim	4,357647	18,4966	1,748071	3,937906	1,643796
<b>1216</b>	Não	-0,1446	0,120893	0,120039	-0,08975	0,02121
<b>1217</b>	Não	0,1446	0,241786	0,187561	-0,04488	0,053026
<b>1218</b>	Sim	3,770825	3,505892	0,660216	0,258039	1,13475
<b>1219</b>	Sim	1,045892	4,110356	1,372948	3,825715	1,580165
<b>1220</b>	Não	1,043084	2,800684	-0,12004	-0,33657	0,318154
<b>1221</b>	Sim	0,345355	65,18138	4,141353	0,796556	9,396151
<b>1222</b>	Não	0,836713	-0,06045	-0,18756	-0,4712	0,074236
<b>1223</b>	Sim	4,403975	-2,17306	0,382625	1,808378	0,286339
<b>1224</b>	Sim	4,469958	52,81313	0,465152	2,94387	0,721149
<b>1225</b>	Sim	-0,56576	6,596791	2,130696	1,345769	3,011859
<b>1226</b>	Sim	1,513966	-2,32828	0,240078	0,399525	0,116657
<b>1227</b>	Não	0,158639	0,155219	-0,10503	0	0,074236

\*Persistência de IgG após 12 meses

† Teste não realizado